Aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
Abt. Wittmann, Berlin-Dahlem

Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus:

Aminosäurenzusammensetzungen und Partialsequenzen der tryptischen Peptide der Hüllproteine von Odontoglossum Ringspot Virus, Birnen-TMV 1 und Cowpea Virus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Hennig
aus Leipzig

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0102

Aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
Abt. Wittmann, Berlin-Dahlem

Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus:

Aminosäurenzusammensetzungen und Partialsequenzen der tryptischen Peptide der Hüllproteine von Odontoglossum Ringspot Virus, Birnen-TMV 1 und Cowpea Virus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Hennig
aus Leipzig

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1970

Dekan: Professor Dr. W. Seyffert

1.Berichterstatter: Professor Dr. H.G. Wittmann

2.Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner

Inhaltsübersicht

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	3
III.	Ergebnisse	8
	Hüllprotein des ORSV	8
	1) Aminosäureanalyse des ungespaltenen Proteins	8
	2) Endgruppenbestimmung der Polypeptidkette	10
	3) Analyse der tryptischen Peptide	10
	4) Analyse der Peptide nach Spaltung des Proteins mit BrCN	26
	5) Zusammenfassung der beim ORSV erzielten Ergebnisse	30
	Hüllprotein des B-TMV 1	32
	1) Aminosäureanalyse des ungespaltenen Proteins	32
	2) Analyse der tryptischen Peptide	32
	3) Ergebnisse der Analyse des B-TMV1-Proteins	37
	Hüllprotein des CPV	38
	1) Aminosäureanalyse des ungespaltenen Proteins	38
	2) Analyse der tryptischen Peptide	38
	3) Ergebnisse der Analyse des CPV-Proteins	43
IV.	Diskussion	45
V.	Zusammenfassung	53
VI.	Literatur	54
	Abkürzungen	62

I. Einleitung

Die Proteinhülle des Tabakmosaikvirus (TMV) besteht aus Untereinheiten, die in ihrer Struktur miteinander identisch sind und deren physiko-chemische Eigenschaften für die Form und Stabilität des Virus verantwortlich sind (ANDERER, 1963; CASPAR, 1963; LAUFFER und STEVENS, 1968). Die Aminosäuren-Bruttozusammensetzung dieses Hüllproteins ist bei den meisten bisher bekannten Stämmen des TMV untersucht worden und ist beim Vergleich der einzelnen Stämme bis zu etwa 20% unterschiedlich. Durch den Vergleich nur der Aminosäuren-Bruttozusammensetzung wird jedoch nicht der volle Umfang der zwischen ihnen vorhandenen Aminosäureaustausche ersichtlich, da sich viele Aminosäureaustausche in der Bruttozusammensetzung miteinander kompensieren können.
Die Häufigkeit solcher Kompensationen wird bereits durch den Vergleich der Aminosäuren-Bruttozusammensetzung von Peptiden des Proteins mit den homologen Sequenzbereichen der bekannten Primärstrukturen wesentlich verringert. Vor allem aber ist zur genaueren Analyse der Genetik des TMV die Kenntnis der Sequenz der Aminosäuren in der Polypeptidkette notwendig: Deren Aminosäuresequenz ist durch den Mechanismus der Proteinbiosynthese direkt mit der Nukleotidsequenz des Hüllprotein-Gens der TMV-RNS korreliert (WITTMANN, 1962; KADO und KNIGHT, 1968). Auf Grund dieser genetischen Codierung der Aminosäurensequenz erscheint es möglich, durch Vergleich der Primärstrukturen des Hüllproteins den Verlauf seiner Evolution abzuleiten und die Struktur von phylogenetischen Vorstufen zu rekonstruieren (DAYHOFF, 1969).
Außerdem bestimmt die Aminosäurensequenz die Art der Faltung der Polypeptidkette zur biologisch aktiven Konformation (ANDERER, 1959; LIQUORI, 1968), so daß durch die vergleichende Analyse sehr zahlreicher homologer Sequenzen aus den festgestellten Restriktionen der Aminosäurenaustausche Regeln dieser Abhängigkeit erkannt und Hinweise auf funktionell bedeutsame Aminosäuren erhalten werden können (PERUTZ et al., 1965; PTITSYN, 1969).
Vergleichende Untersuchungen dieser Art sind bereits an verschiedenen Proteinen durchgeführt worden (vgl. DAYHOFF, 1969).
Entsprechende Untersuchungen am Hüllprotein des TMV sind interessant, da dieses Protein im Virus an die TMV-RNS gebunden ist und damit als

Modell eines Nukleoproteids zur Verfügung steht. Seine Funktionen, die Protein-Protein-Wechselwirkung der Untereinheiten miteinander und ihre Bindung an die RNS, können in vitro getestet werden (SCHRAMM und ZILLIG, 1955; FRAENKEL-CONRAT und WILLIAMS, 1955). Dadurch ist es möglich, den Einfluß der Veränderungen in der Primärstruktur des Hüllproteins auf diese Funktionen experimentell zu prüfen (SARKAR, 1960; JOCKUSCH, 1966; 1968; RENTSCHLER, 1967). Bisher sind 65 unterschiedliche Primärstrukturen des Hüllproteins von Varianten des TMV aufgeklärt worden. Davon unterscheiden sich alle Mutanten und einige Stämme in nur je 1-3 Positionen der Aminosäurensequenz ihrer Hüllproteine (FUNATSU und FRAENKEL-CONRAT, 1964; FUNATSU 1964; WITTMANN - LIEBOLD und WITTMANN, 1965a,b; ROMBAUTS und FRAENKEL-CONRAT, 1968; NOZU und OKADA, 1968; HARIHARASUBRAMANIAN und SIEGEL, 1969).
Dagegen sind umfangreiche Unterschiede zwischen den Stämmen vulgare, dahlemense, U2 und HRG nachgewiesen (ANDERER et al., 1960, 1965; WITTMANN-LIEBOLD und WITTMANN, 1963; WITTMANN, 1965; RENTSCHLER, 1967; FUNATSU und FUNATSU, 1968; JAUREGUI-ADELL, et al., 1969; WITTMANN et al., 1969). Auch in den Stämmen CPV, ORSV, CV4, CGMMV, und SOV sind solche großen Unterschiede im Hüllprotein entsprechend ihrer Aminosäuren-Bruttozusammensetzung wahrscheinlich (REES und SHORT, 1965; PAUL et al., 1965; van REGENMORTEL, 1967; FUNATSU und FUNATSU, 1968; WITTMANN, unveröff. Ergebnisse).

Im folgenden wird über die Isolierung und Analyse der tryptischen Peptide von drei Stämmen des TMV berichtet: dem aus Orchideen isolierten Odontoglossum Ringspot Virus (ORSV), dem aus einer tropischen Bohnenart stammenden Cowpea Virus (CPV) und dem in Kernobstbäumen gefundenen Birnen-TMV 1 (B-TMV1).
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden mit den bekannten proteinchemischen Daten des TMV-Hüllproteins verglichen, und die mögliche Bedeutung bestimmter Restriktionen der Variabilität der Aminosäurensequenz wird diskutiert.

II. Material und Methoden

Herkunft der Virusstämme: Das ORSV wurde ursprünglich aus Orchideen der Gattungen Odontoglossum, Cymbidium und Cattleya isoliert (JENSEN und GOLD, 1951, 1952) und elektronenmikroskopisch, serologisch und chemisch als TMV-Stamm identifiziert (BRÁNDES und CHESSIN, 1965; PAUL et al., 1965; van REGENMORTEL, 1967).
Für die vorliegende proteinchemische Untersuchung wurde Virus auf Nicotiana tabacum var. Samsun vermehrt, das von PAUL et al. (1965) zur Charakterisierung des Stammes verwendet wurde.
Das CPV wurde erstmals aus Vigna ungiculata isoliert (LISTER und TRESH, 1955). Auf Grund seiner biologischen, chemischen und Röntgenstruktur-Analyse (BAWDEN, 1958; HOLMES und FRANKLIN, 1958; REES und SHORT, 1965) wurde seine Zugehörigkeit zur TMV-Gruppe vermutet. Auf Bohnen (Phaseolus vulgaris) vermehrtes, gereinigtes Virus wurde von Dr.C.WETTER (Saarbrücken) erhalten und direkt zur proteinchemischen Analyse verwendet.
Das B-TMV1 wurde von OPEL et al. (1969) aus Birnbaumblättern (Pyrus communis) isoliert und mit Hilfe serologischer und biologischer Tests als ein dem TMV dahlemense nahe verwandtes Virus nachgewiesen. Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung wurde ein infiziertes Birnbaumblatt von Dr.H.OPEL (Aschersleben) zur Verfügung gestellt, und das daraus extrahierte Virus wurde auf Nicotiana tabacum var. Samsun vermehrt.
Präparation des Virus: Aus gefrorenem Blattmaterial wurde das Virus nach der Frigen-Methode (WITTMANN, 1964) bzw. der Polyäthylenglykol-Methode (GOODING und HEBERT, 1967) präpariert, durch differenzielle Zentrifugation gereinigt und in bidestilliertem Wasser bei -10°C gelagert. Die Reinheit des Viruspräparates wurde geprüft durch Messung des Absorptionsspektrums im UV-Wellenlängenbereich $\lambda_{230} - \lambda_{320}$ (in bidest. Wasser bzw. M/15 Phosphatpuffer pH 7), durch analytische Ultrazentrifugation (in 0.02 M Boratpuffer pH 7.2, 20 000 U/min) und durch Polyacrylamid-Discelektrophorese (7% Vernetzung, in 6 M Harnstoff bei pH 9). Die Konzentration des gereinigten Viruspräparates wurde spektralanalytisch bestimmt mit Hilfe des für TMV vulgare bekannten Extinktionswertes $E^{1cm}_{265} = 1.000 = 0.315$ mg/ml (TAKAHASHI, 1951).

Isolierung des Hüllproteins: Das Hüllprotein wurde von der Virus-RNS abgetrennt durch Behandlung des Virus bei 4°C mit 67% Essigsäure (S-Protein; FRAENKEL-CONRAT, 1957), in einigen Fällen bei 4°C mit 6 M Harnstoff in 0.4 M Tris-HCl-Puffer pH 8.6, 0.1 M Äthylendiamintetraacetat, 0.025 M β-Mercaptoäthanol (H-Protein; LAUFFER, 1943; TSUNG und FRAENKEL-CONRAT, 1966). Es wurde durch hochtourige Zentrifugation von ungespaltenem Virus gereinigt und aus verdünnter Essigsäure bzw. nach Dialyse gegen Wasser (mit 0,1% Mercaptoäthanol) lyophilisiert. Die Reinheit des präparierten Proteins wurde spektralanalytisch bei pH 7 im UV-Wellenlängenbereich $\lambda_{230} - \lambda_{320}$ geprüft (FRAENKEL-CONRAT, 1957; PAUL et al., 1965), seine Konzentration wurde durch quantitative Aminosäureanalyse bestimmt.

Aminosäureanalyse: Virus, Protein bzw. Peptid wurde hydrolysiert mit 5.7 n HCl (2x dest.) unter Vakuum oder Stickstoff bei 110°C für 20 - 70 Stunden. Einige Proben wurden zur Kontrolle unter Zusatz von Phenol hydrolysiert, um eine mögliche Halogenierung von Tyrosin zu verhindern (SANGER und THOMPSON, 1963). Das Hydrolysat wurde am Rotationsverdampfer bei etwa 50°C getrocknet, um dadurch die Zersetzung bestimmter Aminosäuren zu verhindern (EAKER, 1968). Die quantitativen Aminosäureanalysen wurden durchgeführt zum Teil mit Werkstattapparaturen nach der Methode von SPACKMAN et al. (1958), vorwiegend auf den Analysatoren Unichrom (Fa. Beckman, München) und Biochrom (Fa. Biocal, München) in der modifizierten Form von HUBBARD (1965). Die meisten Analysen wurden im 2-Säulenverfahren mit den Austauscher-Harzen PA 28 und M 82 bei 55°C und stufenweiser Elution mit den Citratpuffern (0.2 M an Natriumionen) pH 3.12 + 4% Methanol und pH 4.15 und dem Acetatpuffer (2 M an Natriumionen) pH 5.51 im beschleunigten Verfahren durchgeführt (2 Stunden Dauer zur Analyse der sauren und neutralen Aminosäuren). Einige Analysen wurden mit dem 1-Säulenverfahren durchgeführt. Die zur Analyse erforderliche Mindestmenge pro Aminosäure war, je nach Sensitivität des verwendeten Analysators, 1 µMol (Makroküvette, 0-5 mV Schreiberbereich) bis 1 nMol (Mikroküvette, 4 - 5 mV Schreiberbereich gestreckt). Die Flächenkonstanten der Aminosäuregipfel wurden im Routinebetrieb spätestens nach 50 Analysen mit Biocal-Aminosäuren-Calibriergemisch neu ermittelt, im Bedarfsfall, insbesondere bei

den Bruttoanalysen des S-Proteins, vor oder im Anschluß an die entsprechenden Analysen. Korrekturen der Meßwerte für Verluste durch Oxydation und Veresterung während der Hydrolyse (NAUMAN, 1968; DOWNS und PIGMAN, 1969) wurden ermittelt durch Vergleich von Analysen des Hüllproteins des TMV vulgare mit dessen bekannter Aminosäurezusammensetzung: für 20^h - Hydrolyse wurden in allen angegebenen Hydrolysedaten korrigiert Thr: +7%, Ser: +9%, für 70^h-Hydrolyse Thr: +20%, Ser +24%. Diese Korrekturfaktoren stimmen mit den von RAMACHANDRAN (1958) ermittelten überein.
Der Verlust von Met und Tyr während der Analyse war sehr variabel und hing wesentlich von der Behandlung der Peptide vor der Hydrolyse ab (hoher Verlust nach Lagerung der Peptide auf dem Papierchromatogramm). Die Meßwerte dieser beiden Aminosäuren wurden deswegen nicht korrigiert und für die Bruttobestimmung auf den nächsthöheren ganzzahligen Wert aufgerundet. Die schwer hydrolysierenden Peptidbindungen zwischen Val-, Ile- und Leu-Resten wurden nicht durch Korrekturfaktoren berücksichtigt, sondern die Konzentrationswerte dieser Aminosäuren wurden durch Analyse nach Langzeithydrolyse bestimmt.
Cystein wurde quantitativ bestimmt mit 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) nach BUTTERWORTH et al. (1967), Tryptophan mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid nach BARMAN und KOSHLAND (1967) und durch Spektrometrie (GOODWIN und MORTON, 1946; EDELHOCH, 1967). Spektralanalytisch wurde auch der Tyr-Gehalt des Trp-freien Peptides T3 überprüft.
Spaltung mit Endopeptidasen: Folgende Enzyme wurden verwendet: Trypsin (Fa. Boehringer, Mannheim), das nach KOSTKA und CARPENTER (1964) mit L-(1-tosylamido-2-phenyl)-äthylchloromethylketon (TPCK, Fa. Mann Research, New York) behandelt und zur Stabilisierung in 20 mM $CaCl_2$ gelöst wurde (SIPOS und MERKEL, 1968); Chymotrypsin und Subtilisin "Nagarse" (beide Fa. Worthington, Freehold, New Jersey).
Inkubiert wurde 0.1%ige Protein-bzw. Peptidlösung mit 1:100 Enzym bei pH 7.8 und 37^oC für 4 Stunden am pH-Stat (Fa. Radiometer, Kopenhagen). Mit Papain (Fa. Worthington) wurde bei pH 5.5 in 0.2 M Pyridinacetat unter Zusatz von 2,3-Dimercapto-1-propanol zur Aktivierung inkubiert (ANDERER et al., 1965).
Chemische Spaltung: Zur spezifischen Spaltung von Peptidbindungen,

an denen Asparaginsäurereste beteiligt sind, durch partielle Säure hydrolyse (TSUNG und FRAENKEL-CONRAT, 1965) wurden die tryptischen Peptide T2 und T8 mit 0.25 N Essigsäure unter Stickstoff bei 110° für 18 Stunden behandelt. Um spezifisch nach Methionin-Resten zu spalten (GROSS und WITKOP, 1962), wurde Virus in 8 M Harnstoff bei pH 2 (mit HCl eingestellt) mit einem 50fach molaren Uberschuß (berechnet auf die Zahl der Met-Reste) mit BrCN bei 25°C für 20 Stunden inkubiert.

Fraktionierung der Peptide: Die durch enzymatische Spaltung entstandenen Partialpeptide wurden durch Chromatographie auf dem Anionenaustauscher Dowex 1 X2 nach RUDLOFF und BRAUNITZER (1961) unter den von WITTMANN (1965) angegebenen Bedingungen und Verwendung einer Puffergradienten-Mischapparatur (PETERSON und SOBER, 1959) getrennt. Zur Chromatographie der Peptide aus etwa 200 mg Protein wurden 200 x 1.5 cm-Säulen eingesetzt, nach Spaltung von etwa 50 mg Protein 54 x 0.9 cm-Säulen. Zur Trennung der nach chemischer Spaltung erhaltenen Partialpeptide und zur Reinigung von Peptidfraktionen nach Dowex-Chromatographie wurden das Dextran Sephadex G10, G25 und G50 (Fa. Pharmacia, Uppsala) und das Polyacrylamid Biogel P2 (Fa. Biorad, München) benutzt. Eluiert wurde mit 20% Pyridin oder mit 0.2 N Essigsäure. Die säulenchromatographischen Fraktionen wurden auf Peptid getestet mit Ninhydrin-Reagenz (MOORE und STEIN, 1954), Folin-Reagenz (LOWRY et al., 1951) oder durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge λ_{230}. Analytische und präparative Papierchromatographie der Säulenfraktionen wurden auf Chromatographiepapier Nr. 2043b (Fa. Schleicher & Schüll) durchgeführt. Entwickelt wurden diese Chromatogramme ab- oder aufsteigend in den Laufmittelsystemen BEW (n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5, Oberphase; PARTRIDGE und WESTALL, 1948), PyrA (Pyridin : n-Amylalkohol : Wasser : Eisessig = 50 : 40 : 40 : 0,6; WITTMANN-LIEBOLD und WITTMANN, 1964) bzw. PBEW (Pyridin : n-Butanol : Eisessig : Wasser = 20 : 30 : 6 : 24; WALEY und WATSON, 1953) über mindestens 10, maximal 20 Stunden. Die Peptide und freie Aminosäuren wurden auf den Chromatogrammen lokalisiert durch Test der Randstreifen mit Ninhydrin-Reagenz (CONSDEN et al., 1944) bzw. mit t-Butylhypochlorit-KJ-Stärke (MAZUR et al., 1962). Die Peptide wurden außerdem auf bestimmte Aminosäurereste geprüft: auf Arg mit 8-Hydroxychinolin-

Hypobromit (JEPSON und SMITH, 1953), auf Tyr mit diazotierter p-Aminobenzoesäure (O'SULLIVAN, 1966) und auf Trp mit p-Dimethylbenzaldehyd - HCl (SMITH, 1953). Trp-haltige Peptide wurden außerdem identifiziert durch ihre Fluoreszens bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge λ_{254nm}. Die ausgeschnittenen Peptid-haltigen Papierstreifen wurden mit 20% Pyridin eluiert.

Endgruppenbestimmung: Zur Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren wurden die Peptide mit den Exopeptidasen Carboxypeptidase A und B (C'ase A und B; mit Diisopropylfluorophosphat behandelt; Fa. Worthington, Freehold, New Jersey) in 0.02 M Veronalpuffer pH 7.8 bei 25°C bzw. bei 37°C inkubiert. Das Enzym : Substrat-Verhältnis betrug entweder 1:50 oder 1:100.

Die N-terminalen Aminosäuren wurden enzymatisch durch Inkubation mit Leucinaminopeptidase (LAP; Fa. Worthington, Freehold, New Jersey) in Wasser bei pH 7.8 und 37°C abgespalten oder chemisch nach EDMAN (1950) mit Phenylisothiocyanat. Der EDMAN-Abbau wurde in verschiedenen Modifikationen der Methode durchgeführt: a) Reaktion auf Chromatographiepapier Nr. 2043b (Fa. Schleicher & Schüll) nach SCHROEDER et al. (1961) und Restpeptidanalyse; b) Reaktion in Lösung nach BLOMBÄCK et al. (1966), Isolierung des Restpeptides über Dowex 50 nach KONIGSBERG und HILL (1962) und Restpeptidanalyse; c) Reaktion in Lösung nach EDMAN und BEGG (1967) und Direktanalyse der PTH-Aminosäuren. Die zur Reaktion verwendeten Reagenzien wurden speziell gereinigt (BLOMBÄCK et al., 1966; EDMAN und BEGG, 1967) und Phenylisothiocyanat und Triäthylamin unter Stickstoff bei -30°C gelagert. Alle Arbeiten wurden unter Stickstoff durchgeführt. Der Nachweis der PTH-Aminosäuren erfolgte chromatographisch auf Papier nach SJÖQUIST (1960) in den Laufmittelsystemen D und E oder auf den Dünnschichtplatten Kieselgel F_{254} (Fa. Merck, Darmstadt) nach JEPPSON und SJÖQUIST (1967).

III. Ergebnisse

Hüllprotein des ORSV

1) Aminosäureanalyse des ungespaltenen Proteins

Die Meßwerte der Aminosäureanalysen sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Ganzes Virus sowie durch Harnstoff bzw. Essigsäure von der RNS abgetrenntes Protein (H- bzw. S-Protein) wurden zum Vergleich analysiert, um eine eventuelle Zerstörung bestimmter Aminosäuren, insbesondere von Tyr und Met durch Oxydation, während der Präparation des Proteins zu erkennen. Die Proben wurden vor der Hydrolyse besonders von Spuren freier Aminosäuren gereinigt durch isoelektrische Fällung des Virus bzw. Proteins bei pH 4.3 und anschließender Dialyse zuerst gegen 0.1 M KCl und dann gegen bidestilliertes Wasser. Bei der Analyse des ganzen Virus sind nur die Werte für Ser und Gly etwas erhöht gegenüber den Analysen des isolierten Proteins. Das kann jedoch auf Abbauprodukte der RNS zurückgeführt werden.

Zur Kontrolle und unmittelbarem Vergleich der unter identischen Bedingungen erhaltenen Analysenwerte wurde das S-Protein des ORSV außerdem mit dem S-Protein der Stämme vulgare, HRG, B-TMV1 und CPV im Parallelversuch untersucht. Für vulgare und HRG wurden die aus der Literatur bekannten Werte der Bruttozusammensetzung des Hüllproteins erhalten; die Werte der Analysen von B-TMV1 und CPV sind in Tab. 9 und 11 wiedergegeben.

Die Langzeithydrolyse des ORSV-Proteins zeigt den für das Hüllprotein aller bisher untersuchter TMV-Stämme nachgewiesenen Anstieg der Ile-Konzentration gegenüber der normalen Kurzzeithydrolyse, was auf die gegen Säurehydrolyse relativ stabile Ile-Ile-Peptidbindung in Pos. 93/94 (bezogen auf die Aminosäuresequenz von vulgare) zurückgeführt werden kann. Aus diesen Daten folgt unter der Berücksichtigung der Labilität von Met und Tyr während der Hydrolyse (KEUTMANN und POTTS, 1969), sowie der für Cys und Trp besonders durchgeführten Bestimmung die in Tab. 1 angegebene Bruttozusammensetzung des ORSV-Hüllproteins mit 157 Aminosäure-Resten.

Tab.1: Aminosäurebruttoanalyse des ORSV-Hüllproteins

Die Daten unter den Hydrolysezeiten geben die Meßwerte der Aminosäureanalyse nach Hydrolyse des isolierten Proteins bzw. des Virus mit 5.7 n HCl als Molverhältnisse an.+ Nach Korrektur (s. Methoden), a) Bestimmung von Cystein und b) Bestimmung von Tryptophan vergl. Methoden. c) PAUL et al., 1965

	20^h-Hydrolyse S-Protein		H-Protein	24^h Virus	62^h H-Protein	72^h S-Protein	Aminos-Reste gef.	Lit. c)
nMol Protein	2.0	1.9	10.0	2.4	11.3	3.0		
Asp	19.5	20.0	20.0	20.0	19.6	19.3	20	20
Thr	19.1	19.4	19.8	19.7	18.4	17.6		
+	20.5	20.8	21.2	21.1	21.2	21.1	21	21
Ser	11.4	11.0	11.1	13.1	9.5	9.2		
+	12.4	12.0	12.1	14.4	11.8	11.4	12	12
Glu	14.6	14.8	14.9	14.5	14.9	14.6	15	15
Pro	8.8	8.7	9.2	9.3	9.3	8.5	9	9
Gly	7.4	6.8	7.1	7.7	7.3	7.0	7	7
Ala	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11	11
Cys	+	+	+	+	+	+	1[a]	1
Val	8.8	8.6	8.0	8.6	8.1	8.9	9	10
Met	2.2	1.6	2.3	2.3	1.9	2.1	3	3
Ile	6.9	6.8	6.9	6.7	7.5	7.6	8	8
Leu	13.4	13.5	14.0	12.4	13.9	13.8	14	14
Tyr	5.1	5.5	5.6	5.6	5.1	5.4	6	7
Phe	6.9	6.8	7.0	7.0	6.6	7.1	7	7
Lys	1.3	1.0	1.0	n.b.	n.b.	1.1	1	1
His	-	-	-	n.b.	n.b.	-	-	-
Arg	10.0	10.0	10.1	n.b.	n.b.	10.0	10	9
Trp							3[b]	3
Summe der Aminosäurereste							157	158

2) Endgruppenbestimmung der Polypeptidkette

N-Terminus: Durch EDMAN-ABBAU in Lösung und PTH-Direktanalyse konnte keine N-terminale Aminosäure nachgewiesen oder aus beobachteten Abbauprodukten wahrscheinlich gemacht werden. Zusammen mit entsprechenden Ergebnissen am Peptid T1 deutet das in Übereinstimmung mit den meisten bisher untersuchten TMV-Stämmen auf eine Blockierung der NH_2-Gruppe, wahrscheinlich durch eine Acetylgruppe, hin (NARITA, 1958).

C-Terminus: Ungespaltenes Virus und S-Protein wurden mit C'ase A inkubiert und die abgespaltenen Aminosäuren quantitativ bestimmt (Tab.2). Entsprechend diesen Daten ist die C-terminale Sequenz der Polypeptidkette: $-(Thr_1, Ser_2)$-Leu-Ser-Thr

Tab.2: Endgruppenbestimmung am Hüllprotein des ORSV

	nMol abgespaltene Aminosäure					
	Thr	Ser	Gly	Val	Met	Leu
Virus 1:100 C'ase A (37°C, 2^h)	7.8	4.7	-	-	-	2.9
S-Protein (ca 30 nMol je Probe)						
1:100 C'ase A (25°C, 30 min)	15.2	20.2	-	-	-	8.0
Reste	(0.5)	(0.7)				(0.3)
(37°C, 30 min)	52.4	87.3	5.2	-	Spur	26.8
Reste	(1.7)	(2.9)				(0.9)
1:50 C'ase A (37°C, 10^h)	68.9	86.0	11.5	4.1	11.8	31.9
Reste	(2)	(3)				(1)

3) Analyse der tryptischen Partialpeptide

Nach der Inkubation von S- bzw. H-Protein mit Trypsin wurden ungespaltenes Protein und schwer lösliche saure Peptide durch isoelektrische Fällung bei pH 4.3 von den löslichen Peptiden abgetrennt. Das Sediment wurde in etwa 50% Pyridin gelöst und auf Sephadex G50 mit 20% Pyridin fraktioniert (Abb. 1). Die Auftrennung der im Überstand gelösten Peptide wurde entweder durch Gelchromatographie über Sephadex G25, G50 und Biogel bzw. durch Chromatographie über den Anionenaustauscher Dowex 1 X2 erreicht (Abb.1). Die Peptide wurden in den Fraktionen des Eluats papierchromatographisch identifiziert und daraus präparativ gereinigt. Peptidpräparationen aus verschiedenen Fraktionierungsstufen und tryptischen Spaltungen wurden auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin analysiert (Tab.3).

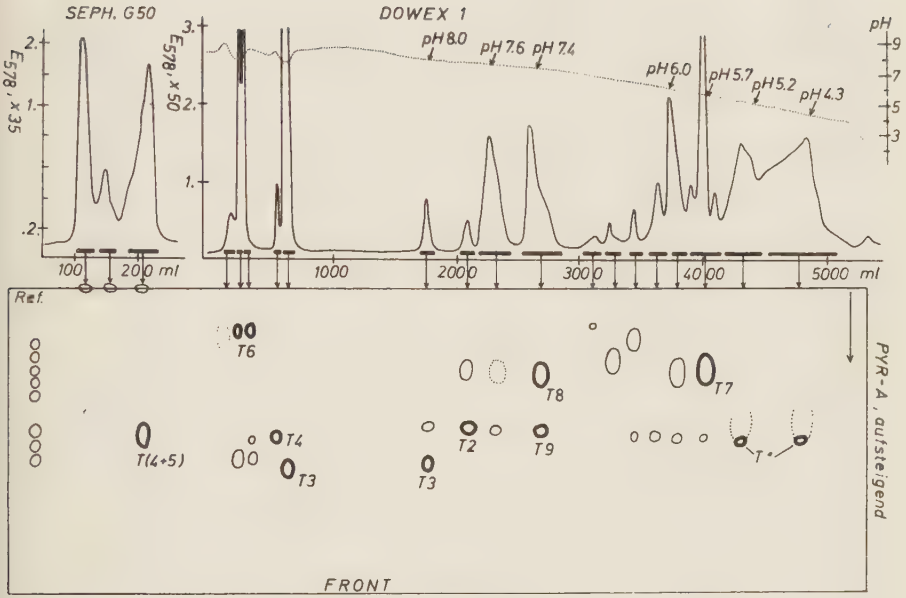


Abb. 1. Trennung der tryptischen Peptide des ORSV-Hüllproteins

Trennung des Sedimentes der isoelektrischen Ausfällung auf Sephadex G50, des Überstandes auf Dowex 1 X2. Test der Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse mit der Ninhydrinreaktion. Papierchromatographie der Peptid-haltigen Fraktionen und Lokalisierung der Peptide durch Sprühteste.

Fortsetzung von Tab. 3

Peptid	Fraktion	Hydrolyse	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Arg	Trp	Summe	pH[1] Farbe[2]
T 6	2.T-D1/Pp	20^h	1.0															1.0			
	3.T-D1/Pp	40^h	1.0															1.1			Front
	Brutto		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		2	gelb-grün
T 7	3.T-D1/Pp	20^h	3.2	4.9^+		4.4	1.9		1.0		1.2		1.0	1.0			n.d.	n.d.			
	4.T-G25/P2	20^h	3.0	5.0^+	0.6^+	4.1	1.8	0.5	1.2		1.1		0.9	1.1				1.0			5.7
	2.T-D1/Pp	40^h	3.0	5.0^+		3.8	2.0		1.1		1.1		1.4	1.0				1.0			blau
	2.T-D1/Pp	60^h	3.0	5.3^+		4.2	2.1		1.2		0.9		1.6	1.0			n.d.	n.d.			
	Brutto		3	5	-	4	2	-	1	-	1	-	2	1	-	-	-	1	-	20	
T 8	3.T-D1/Pp	20^h	2.0	1.0^+					2.0		2.0		0.8				n.d.	n.d.			
	4.T-G25/P2	20^h	2.3	1.4^+	0.2^+	0.5	0.2	0.1	2.0		1.9		1.0	0.3				1.7			7.4
	6.T-D1/Pp/G10	20^h	2.0	1.0^+					2.0		2.0		1.0				n.d.	n.d.			blau
	2.T-D1/Pp	40^h	1.9	1.0^+					2.0		2.2		1.0					1.6			
	Brutto		2	1	-	-	-	-	2	-	2	-	1	-	-	-	-	2	-	10	
T 9	3.T-D1/Pp	20^h	n.d.	0.2^+	1.0^+	1.1			1.1		1.0		0.9	2.8			n.d.	n.d.			
	6.T-D1/Pp/G10	25^h	2.8		1.1^+	1.2		0.2	1.0		0.9		0.9	2.6			n.d.	n.d.			7.4
	2.T-D1/Pp	40^h	2.9		1.0^+	1.0			1.0		1.1		1.0	3.0				1.1			blau
	Brutto		3	-	1	1	-	-	1	-	1	-	1	3	-	-	-	1	-	12	
T10	abgeleitet nach Analysen der BrCN-Spaltung Brutto		1	4	4	2	-	3	-	-	1	2		1	1	1	-	-	1	21	
T1-T10 Protein			20	21	12	15	9	7	11	1	9	3	8	14	6	7	1	10	3	157	
			20	21	12	15	9	7	11	1	9	3	8	14	6	7	1	10	3	157	

Tab. 3: Tryptische Peptide des ORSV-Hüllproteins, Aminosäureanalysen nach Hydrolyse mit 5.7 n HCl (Mol-Verhältnisse). Für jedes Peptid sind Analysendaten aus verschiedenen Reinigungsstufen bzw. tryptischen Hydrolysaten gegeben, $^{+}$korrigiert für Hydrolyseverlust.
[1] pH-Wert der Elution von Dowex 1, [2] Farbe des Ninhydrin-Komplexes

Peptid	Fraktion	Hydrolyse	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Arg	Trp	Summe	pH[1] Farbe[2]
T 1	4.T-1/1	20^{h}	5.7	4.0^{+}	5.9^{+}	4.4	1.9	1.3	4.0	0.7	0.3		1.8	5.2	1.6	1.2	n.d.	n.d.	+		
	3.T-D1/Pp	20^{h}	6.3	4.0^{+}	5.9^{+}	4.1	2.0	1.5	4.0	+	0.9		2.0	5.0	1.3	1.1	0.4	1.0	+		5.2/4.3
	4.T-G25/P2/Pp	27^{h}	6.2	4.0^{+}	5.9^{+}	4.0	1.8	1.6	4.0	+	0.5		2.1	5.1	1.4	1.5	0.7	0.8	+		gelb
	1.T-G25/G50/Pp	40^{h}	6.0	4.1^{+}	5.8^{+}	4.7	1.5	1.8	4.4	+	0.9		1.7	5.0	0.9	1.4	0.6	1.1	+		(→blau)
	Brutto		6	4	6	4	2	1	4	(1)	-	-	2	5	2	1	1	1	(1)	41	
T 2	2.T-D1	20^{h}	1.2	3.8^{+}	1.1^{+}	4.0	1.7	0.1	1.1		2.9			1.1		1.0		0.8	+		
	2.T-D1	20^{h}	1.0	4.1^{+}	1.1^{+}	4.0	1.9		1.2		3.0			1.0		0.9	n.b.	n.b.	+		7.6
	2.T-D1/Pp	40^{h}	1.1	3.4^{+}	1.4^{+}	3.8	1.8	0.9	1.4		2.9			1.2		1.0		1.0	+		grau-blau
	Brutto		1	4	1	4	2	-	1	-	3	-	-	1	-	1	-	1	(1)	20	
T 3	1.T-G25/G50/Pp	20^{h}			0.2^{+}		0.9	1.9	2.0						0.9	1.8	n.b.	b.b.			
	3.T-D1/Pp	20^{h}					0.9	2.0	2.0						0.7	2.0		1.1			8.0
	2.T-D1/Pp	40^{h}					1.0	2.0	2.2						0.3	1.8	n.b.	b.b.			ocker
	Brutto		-	-	-	-	1	2	2	-	-	-	-	-	1	2	-	1	-	9	
T 4	5.T-D1/Pp	20^{h}									1.0				1.0			0.9			
	5.T-D1/Pp	40^{h}									1.0				0.7			n.b.			8.0
	Brutto		-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	3	blau
T 4 + 5	2.T-G50/Pp	20^{h}	3.0	3.0^{+}	0.5^{+}		1.9	1.5			0.7($-SO_2$)		1.8	2.8	1.3	2.0	n.b.	b.b.			
	2.T-G50/Pp	40^{h}	3.0	3.1^{+}			2.1	1.1			1.0	0.5	2.1	3.2	1.6	2.2		1.9			isoel.
	2.T-G50/Pp	44^{h}	3.0	3.0^{+}	0.8^{+}	0.3	1.8	1.6	0.3		0.8($-SO_2$)		1.9	2.8	1.1	1.9	n.b.	n.b.			(4.3)
	Brutto		3	3	-	-	2	1	-	-	1	1	2	3	2	2		2		19+3	blau

Da das Hüllprotein des ORSV 11 basische Aminosäurereste pro Polypeptidkette enthällt, sind nach tryptischer Spaltung maximal 12 Peptide zu erwarten: 11 Peptide mit C-terminaler basischer Aminosäure und 1 Peptid ohne basische Aminosäure.
9 tryptische Peptide konnten isoliert werden. Sie enthalten alle einen C-terminalen Arg-Rest; außerdem enthält eines dieser Peptide einen weiteren Arg-Rest (T8) und ein anderes Peptid (T1) einen Lys-Rest. Damit zerfällt das Protein des ORSV in 10 tryptische Peptide. Nicht isoliert werden konnte das C-terminale tryptische Peptid T10. Seine Struktur geht jedoch aus der Analyse der Peptide nach BrCN-Spaltung hervor (vgl. S. 26).

ORSV Peptid T 1 (Pos.1-41 nach Homologie mit vulgare)
Asx_6,Thr_4,Ser_6,Glx_4,Pro_2,Gly_1,Ala_4,Ile_2,Leu_5,Tyr_2,Phe_1,Lys_1, Arg_1,Trp_1,Cys_1

Das "core"-Peptid des ORSV-Proteins fällt im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Stämmen des TMV nicht bei pH 4.3 aus und muß chromatographisch von den übrigen Peptiden abgetrennt werden. Seine Stellung als N-terminales Peptid in der Polypeptidkette geht daraus hervor, daß alle Versuche erfolglos blieben, die N-terminale Aminosäure mit Hilfe der EDMAN-Reaktion (auf Papier und in Lösung; Restpeptid-Differenzanalyse und PTH-Direktanalyse) zu bestimmen oder enzymatisch mit Leucinaminopeptidase abzuspalten (Inkubation bei 37°C bis zu 10^h). Die Ninhydrin-positive Reaktion des Peptides ist vermutlich nur durch die ε-Aminogruppe des Lysinrestes bedingt.

ORSV Peptid T 2 (Pos. 42 - 61 nach Homologie mit vulgare)
Asp_1,Thr_4,Ser_1,Gln_4,Pro_2,Ala_1,Val_3,Leu_1,Phe_1,Arg_1,Trp_1

Das Peptid wurde bei der Chromatographie über Dowex 1 im neutralen bis schwach alkalischen Pufferbereich eluiert und enthält damit nur 1 saure Aminosäure, und zwar entsprechend der Essigsäurespaltung Asparaginsäure. Daher müssen die Glx-Reste amidiert sein.
N-Terminus: Durch Differenzanalyse nach EDMAN-Abbau ist Thr als N-terminale Aminosäure nachgewiesen (Tab.4).

Partialpeptide: Das Peptid T2 wurde mit Essigsäure gespalten und der Verlauf der Reaktion durch analytische Papierchromatographie verfolgt. Die präparative Trennung der Partialpeptide gelang durch Chromatographie über Sephadex G10 mit 1 N Essigsäure, die Nachreinigung papierchromatographisch im System PyrA (Abb.2). Neben freier Asparaginsäure wurden folgende Peptide isoliert (Tab.4):

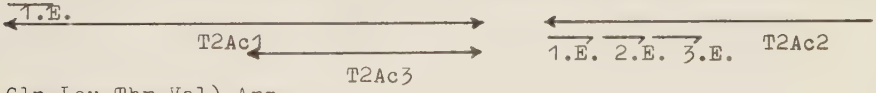
T2Ac1 Thr_2, Gln_3, Ala_1, Val_1, Phe_1

T2Ac2 Thr_2, Ser_1, Gln_1, Pro_2, Val_2, Leu_1, Arg_1, Trp +
1.EDMAN. Differenzanalyse: -Val (Tab.4)
PTH-Direktanalyse: PTH-Val (papierchromat.im System D und durch Dünnschichtchromat.)
2.EDMAN. PTH-Direktanalyse: PTH-Trp (papierchromat.im System E und durch Dünnschichtchromat.)
3.EDMAN. PHT-Direktanalyse: PHT-Thr (Dünnschichtchromat.)

T2Ac3 Gln_2, Ala_1, Phe_1

Da das Arg-haltige Peptid T2Ac2 das C-terminale Partialpeptid von T2 sein muß, ist die Partialstruktur von T2:

Thr-(Thr,Val,Gln)-(Gln,Gln,Phe,Ala)-Asp-Val-Trp-Thr-(Pro,Ser,Pro,



Gln,Leu,Thr,Val)-Arg

Tab.4: Partialpeptide von T2
Aminosäureanalysen nach Säurehydrolyse
(Mol-Verhältnisse),+ Korrekturen vgl. METHODEN

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	Arg	Trp
T2, 20^h	1.1	3.8+	1.1+	4.0	1.7	0.1	1.1	2.9	1.0	1.0	0.8	+
T2, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h	1.2	3.3+	1.3	4.0	1.5		1.2	2.8	1.1	1.0	n.b.	n.b.
T2Ac1, 20^h		1.9+		3.0			0.6	1.0		0.6		
T2Ac2, 42^h		1.7+	1.1+	1.0	2.1	0.2		1.7	1.0		+	+
T2Ac2, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h		1.9+	1.2+	1.3	1.6			1.1	1.0		+	+
T2Ac3, 20^h				2.0			1.1			1.1		

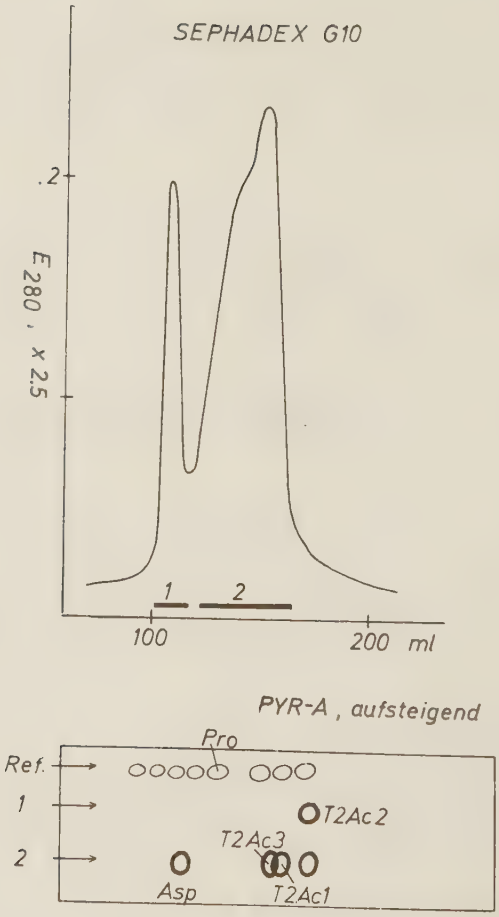


Abb. 2. Trennung der Partialpeptide nach Essigsäurespaltung von T2 des ORSV-Proteins auf Sepnadex G10 und durch Papierchromatographie

ORSV Peptid T 3 (Pos.62-68 nach Homologie mit vulgare)

$Pro_1, Gly_2, Ala_2, Tyr_1, Phe_2, Arg_1$

Das Peptid T3 ist bei der papierchromatographischen Analyse an dem intensiv ockerfarbenen Komplex zu erkennen, den es mit Ninhydrin bildet. T3 wurde aus mehreren tryptischen Spaltungen mit verschiedenen chromatographischen Methoden isoliert (Gelchromatographie über Sephadex G25, G50 und Biogel P2; Ionenaustauschchromatographie über Dowex 1; Papierchromatographie). Säurehydrolysen aller Präparationen des Peptides führten zu den gleichen Werten der Aminosäurezusammensetzung (vgl. Tab.3). Weder Spuren von Methionin, noch von Met-Sulfoxyd bzw. Met-Sulfon wurden bei der Aminosäureanalyse entdeckt. Das Vorkommen von Tryptophan wurde durch Untersuchung des Absorptionsspektrums von T3 im UV-Wellenlängenbereich $\lambda_{230} - \lambda_{320}$ ausgeschlossen. Der Tyrosin-Gehalt wurde besonders überprüft: a) durch Hydrolyse des Peptides unter Zusatz von Phenol (Tab.5), das die Zerstörung von Tyrosin hemmt; b) durch quantitative Auswertung des UV-Absorptionsspektrums von T3. Die Aminosäureanalyse ergab 1 Tyr-Rest pro Peptidmolekül, die Spektralanalyse 1,2 Mol Tyrosin pro Mol Peptid T3.

N-Terminus: Die N-terminalen Aminosäurereste wurden durch EDMAN-Abbau bestimmt.

1.EDMAN. Differenzanalyse: -Phe (Tab.5)
PTH-Direktanalyse: PTH-Phe (Dünnschichtchromat.)

2.EDMAN: Differenzanalyse: -Pro (Tab.5)
PTH-Direktanalyse: PTH-Pro (Dünnschichtchromat.)

C-Terminus: Die C-terminalen Aminosäurereste wurden durch Inkubation mit C'ase abgespalten.

Abbau mit C'ase B (1^h): als freie Aminosäuren sind nachweisbar Arg, Tyr und Phe
Als Restpeptid wurde papierchromatographisch isoliert: $Pro_1, Gly_2, Ala_2, Phe_1$ (Tab.5).

Abbau mit C'ase B (1^h) und weitere 6^h mit C'ase A: als freie Aminosäuren sind nachweisbar Arg, Tyr und Phe; Gly und Ala sind bei der quantitativen Analyse und papierchromatographisch als Spuren nachweisbar.

Abbau mit C'ase A (18^h): freie Aminosäuren waren nicht nachzuweisen.

Partialpeptide: T3 wurde enzymatisch mit Subtilisin hydrolysiert (5^h). Die Partialpeptide wurden über Dowex 1 X2 fraktioniert (Säule 30 x 1.5 cm; Puffergradient von pH 8.8 mit 1% Pyridin-1% Kollidin auf pH 5.0 mit 2% Pyridin - 2% Picolin - 2% Lutidin; Abb.3). Die Partialpeptide wurden papierchromatographisch gereinigt (System PyrA) und nach Säurehydrolyse analysiert (Tab.5). Folgende Peptide wurden isoliert:

T3S1 Phe_1, Arg_1

T3S2 Gly_1, Ala_1

1.EDMAN. Differenzanalyse: -Gly (Tab.5)

T3S3 $Pro_1, Gly_1, Ala_2, Phe_1$

1.EDMAN. Differenzanalyse: -Phe (Tab.5)

C'ase A: Ala freigesetzt

T3S5 Pro_1, Ala_1, Phe_1

C'ase A: (6^h): keine freie Aminosäure nachweisbar

T3S6 Gly_1, Tyr_1

1.EDMAN. Differenzanalyse: -Gly (Tab.5)

Zur Sicherung der aus diesen Ergebnissen abgeleiteten Sequenz wurde das Peptid T3 außerdem mit Chymotrypsin gespalten (4^h). Die Partialpeptide wurden papierchromatographisch getrennt (System BEW; Abb.3). Durch diese enzymatische Hydrolyse entstanden freies Arginin und die beiden Partialpeptide:

T3C2 Phe_1, Arg_1 und T3C3 $Pro_1, Gly_2, Ala_2, Tyr_1, Phe_1$.

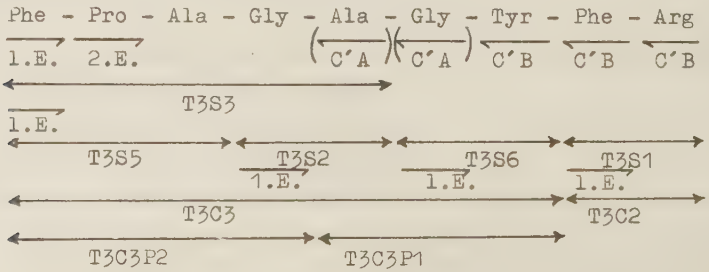
Das Peptid T3C3 wurde mit Papain nachgespalten, die entstandenen Partialpeptide durch Papierchromatographie (System BEW; Abb.3) gereinigt und analysiert (Tab.5):

T3C3P1 Gly_1, Ala_1, Tyr_1

T3C3P2 $Pro_1, Gly_1, Ala_1, Phe_1$

Diese Partialpeptide bestätigen die Struktur von T3.

Zusammenfassung der Sequenzanalyse von T3:



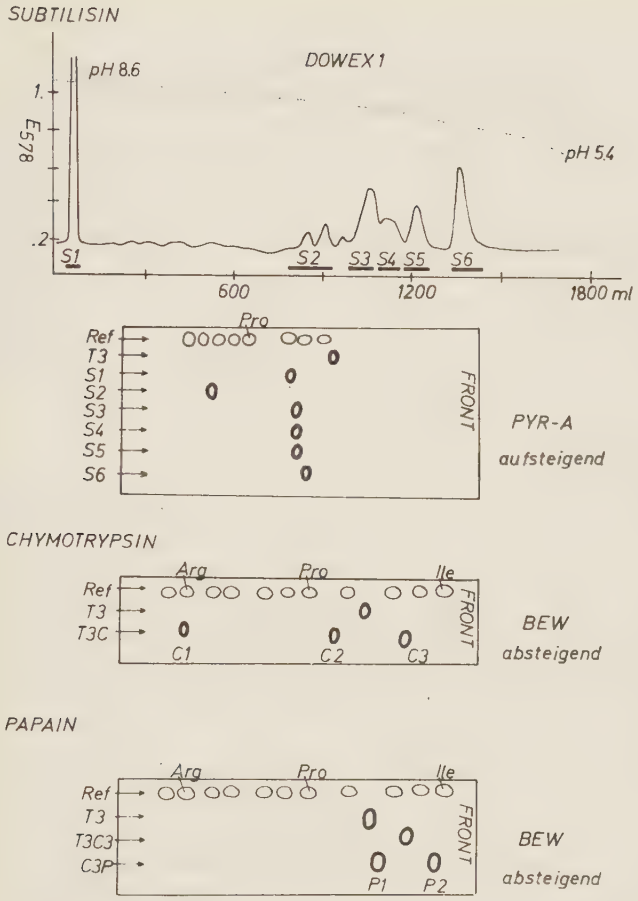


Abb. 3. Trennung der Partialpeptide nach Subtilisin- bzw. Chymotrypsin-Spaltung von T3 des ORSV-Proteins und von T3C3 nach Papain-Spaltung

Trennung der Subtilisin-Peptide auf Dowex 1 X2. Test der Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse mit der Ninhydrinreaktion. Papierchromatographie der Peptid-haltigen Fraktionen. Trennung der Chymotrypsin- und der Papain-Peptide durch Papierchromatographie. Lokalisierung der Peptide auf dem Papierchromatogramm durch Sprühteste.

Tab. 5 Partialpeptide von T3

Aminosäureanalysen nach Säurehydrolyse mit 5.7. n HCl (Mol-Verhältnisse)

	Pro	Gly	Ala	Tyr	Phe	Arg
T3, 20^h	0.9	1.9	2.0	0.9	1.8	1.1
T3 + Phenol, 22^h	1.0	2.0	2.0	1.0	1.8	1.0
T3, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h	0.8	2.0	2.0	0.9	1.1	+
T3, 2.EDMAN Restpeptid, 20^h	0.2	2.1	2.0	0.9	1.1	1.0
T3, C'ase B 1^h Restpeptid, 20^h	1.1	2.1	2.1		0.9	
T3, C'ase B 1^h + C'ase A 6^h, freie Aminosäuren		0.1	0.1	0.9	1.0	+
T3S1, 20^h					1.0	1.0
T3S2, 20^h		1.1	1.0			
T3S2, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h		0.4	1.0			
T3S3, 20^h	0.8	1.1	2.0		0.9	
T3S3, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h	1.0	1.0	2.0		0.1	
T3S3, C'ase A 6^h, freie Aminosäuren			+			
T3S4, 20^h						
T3S5 20^h	1.1		1.1		1.0	
T3S5, C'ase A 6^h, Restpeptid, 20^h	1.0		1.0		1.0	
T3S6, 20^h		1.0		0.9		
T3S6, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h		0.5		1.0		
T3C3P1, 20^h		1.0	1.0	0.7		
T3C3P2, 20^h	0.9	1.0	1.0	0.8		

ORSV Peptid T 4 (Pos.69-71 nach Homologie mit vulgare)

Val_1, Tyr_1, Arg_1

Das Peptid wurde sowohl als einfaches tryptisches Peptid T4 aus der Dowex 1-Fraktionierung isoliert, als auch bei mehreren Spaltungen zusammen mit T5 als tryptisches Dipeptid T(4+5) aus dem Sediment der pH 4.3-Fällung erhalten.

N-Terminus: Durch EDMAN-Abbau am tryptischen Dipeptid T(4+5) wurde in der PTH-Direktanalyse Valin als N-terminale Aminosäure nachgewiesen.

C-Terminus: Die C-terminale Aminosäure ist entsprechend der enzymatischen Spezifität des Trypsin der Arginin-Rest des T4.

Damit hat das Peptid T4 die Sequenz:

Val - Tyr - Arg

ORSV Peptid T5 (Pos.72-90 nach Homologie mit vulgare)

$Asx_3, Thr_3, Pro_2, Gly_1, Met_1, Ile_2, Leu_3, Tyr_1, Phe_2, Arg_1$

Das Peptid T5 wurde als tryptisches Dipeptid T(4+5) durch isoelektrische Präzipitation bei pH 4.3 von den übrigen tryptischen Peptiden abgetrennt. Ein papierchromatographisch isoliertes Präparat wurde über Biogel P2 mit 0.2 N Essigsäure eluiert und spektralanalytisch untersucht im UV-Wellenlängenbereich $\lambda_{230} - \lambda_{320}$: das Peptid enthält kein Tryptophan.

ORSV Peptid T 6 (Pos.91-92 nach Homologie mit vulgare)

Asn_1, Arg_1

Das Peptid wurde von Dowex 1 im alkalischen Pufferbereich eluiert; der Asx-Rest muß damit amidiert sein.

Die Sequenz von T6 ist entsprechend der enzymatischen Spezifität von Trypsin:

AsN - Arg

ORSV Peptid T 7 (Pos.93-112 nach Homologie mit vulgare)

$Asx_3, Thr_5, Glx_4, Pro_2, Ala_1, Val_1, Ile_2, Leu_1, Arg_1$

Zur vollständigen Aminosäureanalyse ist langzeitige Säurehydrolyse notwendig, was durch die N-terminale Ile-Ile-Peptidbindung bedingt ist.

N-Terminus: Die aus der Aminosäureanalyse vermutete Ile-Ile-Sequenz wird durch EDMAN-Abbau bestätigt.

1. EDMAN. Differenzanalyse: -Ile

PTH-Direktanalyse: PTH-Ile (Dünnschichtchromat.)

2.EDMAN. PTH-Direktanalyse: PTH-Ile (Dünnschichtchromat.)
Bei einer Wiederholung des Versuchs wurde beim 2.EDMAN-Abbau neben PTH-Ile auch PTH-Pro im Dünnschichtchromatogramm gefunden. Das ist wahrscheinlich durch Hydrolyse einer Asp-Pro-Peptidbindung (Pos.109/110 ?) während der Cyclisierung des 1.EDMAN-Abbaues durch nicht ganz wasserfreie Trifluoressigsäure bedingt.
C-Terminus: Durch Inkubation von T7 mit C'ase B + A (1^h + 15^h) wurde nur Arginin abgespalten.

ORSV Peptid T 8 (Pos.113-122 nach Homologie mit vulgare)
Asp_2,Thr_1,Ala_2,Val_2,Ile_1,Arg_1
Das Peptid wurde im neutralen Pufferbereich von Dowex 1 eluiert. Da es Arg-Reste enthält, müssen deshalb die beiden Asx-Reste als Asparaginsäure-Reste vorliegen.
Die Bruttozusammensetzung von T8 ist damit identisch mit dem homologen Sequenzbereich der bekannten Hüllprotein-Sequenzen anderer TMV-Stämme.
N-Terminus: Durch EDMAN-Abbau in Lösung und Aminosäureanalyse des über Dowex 50 isolierten Restpeptides wurde nachgewiesen (Tab.6):
1.EDMAN: -Arg; 2.EDMAN: -Val; 3.EDMAN: -Asp; 4.EDMAN:-Asp
C-Terminus: Durch Inkubation von T8 mit C'ase B + A (1^h+ 15^h) wurden die Aminosäuren Thr, Ala, Val, Ile und Arg freigesetzt und papierchromatographisch nachgewiesen.
Nach Essigsäurespaltung und Umsetzung des unfraktionierten Peptidgemisches mit Phenylisothiocyanat wurde bei PTH-Direktanalyse im Dünnschichtchromatogramm PTH-Ala nachgewiesen (PTH-Arg wird bei dem verwendeten Verfahren nicht isoliert).
Die Struktur des Peptides T8 ist damit:

Arg-Val-Asp-Asp-Ala-(Thr,Val,Ala,Ile)-Arg

Tab.6: Endgruppenbestimmung an T8 , Aminosäureanalysen (Mol-Verhältnisse), +nach Korrektur (vgl. Methoden)

	Asp	Thr	Ala	Val	Ile	Arg
T8, 20^h	2.2	1.3+	2.0	2.0	1.1	2.0
T8, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h	2.2	1.3+	2.0	1.9	1.0	1.0
T8, 2.EDMAN Restpeptid, 20^h	2.2	1.3+	2.0	1.1	0.9	n.b.
T8, 3.EDMAN Restpeptid, 20^h	1.3	1.4+	2.0	1.0	0.8	n.b.
T8, 4.EDMAN 20^h	0.7	1.2+	2.0	0.9	1.0	n.b.

ORSV Peptid T 9 (Pos.123-134 nach Homologie mit vulgare)

Asn_3,Ser_1,Glu_1,Ala_1,Val_1,Ile_1,Leu_3,Arg_1

Das Peptid T9 wird von Dowex 1 im neutralen Pufferbereich eluiert und kann damit nur 1 saure Aminosäure enthalten. Da das neutrale Partialpeptid T9S2-b die 3 Asx-Reste von T9, aber nicht den Glx-Rest enthält, und andererseits das schwach saure Partialpeptid T9S6-a diesen Glx-Rest und keinen Asx-Rest hat, muß der Glx-Rest von T9 als Glutaminsäure vorliegen; die Asx-Reste müssen amidiert sein.

N-Terminus: Die N-terminale Sequenz Ser-Ala wurde durch EDMAN-Abbau bestimmt (Differenzanalyse; Tab.7).

Partialpeptide: Das Peptid T9 wurde enzymatisch mit Subtilisin hydrolysiert (4^h). Die Partialpeptide wurden über Dowex 1 X2 fraktioniert (Säule 30 x 1.5 cm; pH-Gradient von pH 8.8-Puffer 1% Pyridin - 1% Kollidin auf pH 4.0-Puffer 3% Pyridin - 3% Picolin - 3% Lutidin; Abb.4). Die Peptide wurden papierchromatographisch nachgereinigt (System PyrA). Folgende Partialpeptide von T9 wurden auf diese Weise isoliert (Tab.7):

a) das N-terminale Peptid T9S3-b: Asn_1,Ser_1,Ala_1,Ile_1
   1.EDMAN. Differenzanalyse: -Ser (Tab.7)
   2.EDMAN. Differenzanalyse: -Ala (Tab.7)

b) die längeren N-terminalen Bruchstücke:
   T9S2-a = T9S3-a Asn_2,Ser_1,Ala_1,Ile_1 und
   T9S3-d Asn_2,Ser_1,Ala_1,Ile_1,Leu_2
   C'ase A (36°C, 30 min): nur Leucin als freie Aminosäure nachweisbar
   T9S2-b Asn_3,Ser_1,Ala_1,Ile_1,Leu_2

c) die Peptide aus dem mittleren Sequenzbereich von T9:
   T9S6-b Asn_2,Glu_1,Leu_2
   T9S7-a Asn_1,Glu_1,Leu_1
   1.EDMAN. Differenzanalyse: -Asn (Tab.7)
   T9S6-a Glu_1,Leu_1
   1.EDMAN. Differenzanalyse: -Glu (Tab.7)

d) die basischen C-terminalen Peptide:
   T9S1-b Leu_1,Val_1,Arg_1
   T9S1-a Val_1,Arg_1

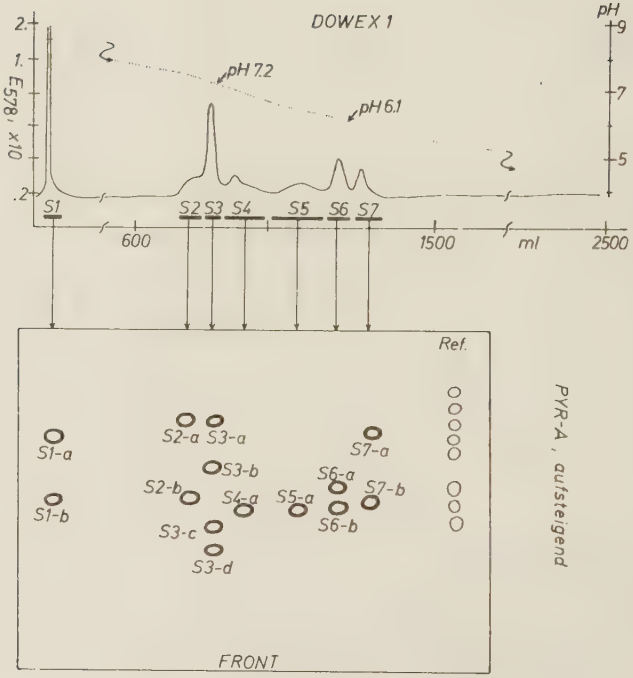


Abb. 4. Trennung der Partialpeptide nach Subtilisin-Spaltung von T9 des ORSV-Proteins auf Dowex 1 X2 und durch Papierchromatographie

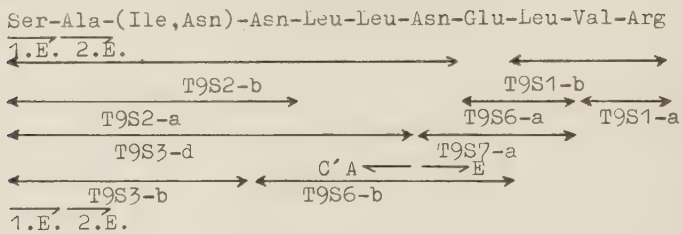
Test der Dowex-Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse mit der Ninhydrinreaktion. Papierchromatographie der Peptid-haltigen Fraktionen und Lokalisierung der Peptide auf dem Chromatogramm durch Sprühteste.

Tab.7 Partialpeptide von T9

	Aminosäureanalysen nach Säurehydrolyse mit 5.7 n HCl (Mol-Verhältnisse)							
	Asp	Ser	Glu	Ala	Val	Ile	Leu	Arg
T9, 20^h	3.1	1.0+	1.2	1.0	0.9	0.9	2.9	+
T9, 1.EDMAN Restpeptid, 40^h	3.0	0.2+	1.1	1.1	1.0	1.0	3.0	n.d.
T9, 2.EDMAN Restpeptid, 40^h	3.0	0.2+	1.1	0.5	1.1	0.8	3.0	n.d.
T9S1-a, 20^h					+			+
T9S1-b, 20^h					1.0		1.0	+
T9S2-a, 20^h	2.0	0.9+		1.0		0.9		
T9S2-b, 20^h	2.9	0.8+		1.0		1.0	2.2	
T9S3-a, 20^h	1.8	1.3+		1.1		0.9		
T9S3-b, 20^h	1.2	1.2+		1.0		1.0		
T9S3-b, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h	1.1	0.2+		1.0		1.0		
T9S3-b, 2.EDMAN Restpeptid, 20^h	1.0			0.7		0.9		
T9S3-c, 20^h	1.9	1.1+		1.2		0.9	1.7	
T9S3-d, 20^h	1.9	0.8+		1.0		1.0	2.0	
T9S3-d, C'ase A freie Aminosäuren							+	
T9S4-a, 20^h	2.2	1.1+		1.0		0.7	3.0	
T9S5-a, 20^h	2.7	1.2+	1.1	1.0	0.9	0.9	2.7	+
T9S6-a, 20^h			1.0				1.2	
T9S6-a, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h			0.1				1.0	
T9S6-b, 20^h	2.0		1.0				2.3	
T9S7-a, 20^h	1.0		1.0				1.0	
T9S7-a, 1.EDMAN Restpeptid, 20^h	0.2		1.0				1.1	
T9S7-b, 20^h	1.0						1.0	

+Werte für Serin korrigiert für Hydrolyseverlust (vgl. Methoden)

Damit ist die Struktur von T9:



4) Analyse der Peptide nach Spaltung des Proteins mit BrCN

Das Hüllprotein des ORSV enthält 3 Met-Reste. Bei seiner Spaltung mit BrCN sind daher 4 Peptide zu erwarten. Deren Analyse ist geeignet, die Reihenfolge der tryptischen Peptide in der Polypeptidkette zu überprüfen. Da außerdem zwei der Met-Reste des Proteins in dem nicht als tryptisches Peptid T10 isolierten C-terminalen Sequenzbereich lokalisiert sind, kann dessen Struktur durch die Analyse der BrCN-Peptide nachgewiesen werden.
Das durch die Spaltung des Proteins mit BrCN erhaltene Peptidgemisch wurde auf Sephadex G50 mit 20% Pyridin chromatographiert (Abb.5). Die Peptidfraktionen wurden papierchromatographisch gereinigt, und ihre Aminosäure-Bruttozusammensetzung wurde analysiert (Tab.8).

Peptid B 1 (Pos.1-84 nach Homologie mit vulgare)

Dieses Peptid enthält den blockierten N-Terminus der Polypeptidkette des Proteins, da trotz wiederholter Versuche, durch EDMAN-Abbau die N-terminale Aminosäure abzuspalten, bei der Direktanalyse keine PTH-Aminosäure nachgewiesen werden konnte.
Anhaltspunkt für die Abteilung der Aminosäure-Bruttozusammensetzung von B1 aus den Daten der quantitativen Aminosäureanalyse ist der Wert für Lysin, da im Protein nur 1 Lysin-Rest enthalten ist. Das Peptid besteht danach aus 86 Aminosäureresten. Entsprechend den vier Arg-Resten und der übrigen Aminosäure-Bruttozusammensetzung umfaßt das Peptid B1 die tryptischen Peptide: T1, T2, T3, T4 und T5 (nur N-terminaler Bereich). Die Zusammensetzung des N-terminalen Bereiches von T5 kann durch Vergleich der Werte der Bruttozusammensetzung dieser Peptide abgeleitet werden:

N-Term T5 Asx_2, Thr_1, Pro_2, Ile_2, Leu_3, Tyr_1, Phe_1, Met_1

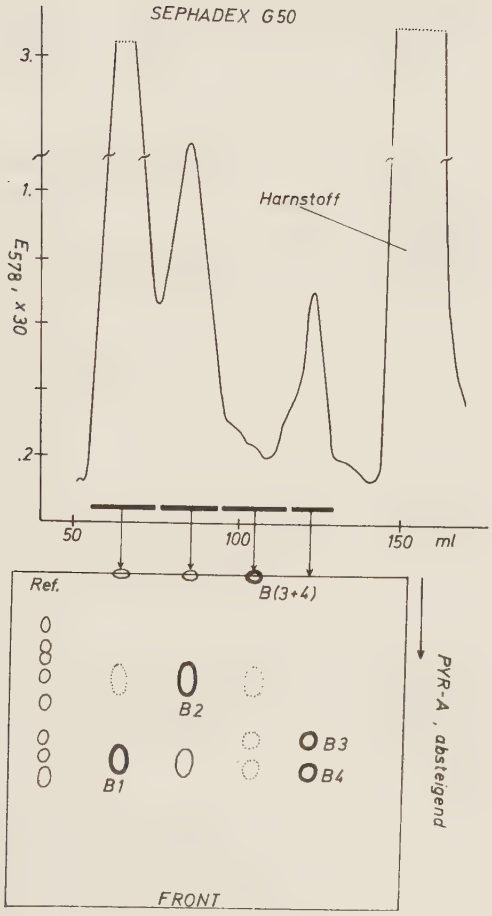


Abb. 5. Trennung der Peptide nach BrCN-Spaltung des ORSV-Hüllproteins auf Sephadex G50 und durch Papierchromatographie

Test der Sephadex-Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse mit der Ninhydrinreaktion. Papierchromatographie der Peptid-haltigen Fraktionen und Lokalisierung der Peptide auf dem Chromatogramm durch Sprühteste

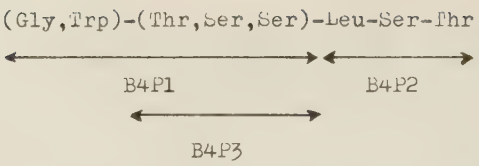
Tab. 8: Peptide des ORSV-Hüllproteins nach BrCN-Spaltung
Aminosäureanalysen nach Hydrolyse mit 5.7 n HCl (Mol-Verhältnisse); $^{+}$korrigiert für Hydrolyseverlust. Der Ile-Wert in der Bruttozusammensetzung von B 2 ist korrigiert für die Ile-Ile-Bindung von Pos. 93/94.

Peptid	Hydrolyse	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Trp	Homoserin	Summe
B 1	20^{h}	8.6	8.9^{+}	7.5^{+}	7.6	7.1	2.9	7.0	+	3.8	3.6	8.4	4.4	5.2	n.b.	n.b.	n.b.	+	+	
	20^{h}	8.5	8.9^{+}	7.6^{+}	7.9	6.6	3.7	7.0	+	3.5	3.9	9.0	n.b.	4.6	1.0	-	3.9	+	+	
	Brutto	(9)	(9)	(7)	(8)	(7)	(3)	(7)	(1)	(4)	(4)	(9)	(5)	(5)	(1)	-	(4)	(2)	(1)	86
B 2	20^{h}	9.4	8.7^{+}	1.6^{+}	5.0	1.7	3.2	4.2		4.0	2.8	4.2		1.0	n.b.	n.b.	n.b.		+	
	20^{h}	10.0	8.8^{+}	1.5^{+}	5.3	1.9	2.7	4.0		3.9	2.6	3.7		1.1			6.0		+	
	Brutto	(10)	(9)	(1)	(5)	(2)	(3)	(4)		(4)	(3+1)	(4)		(1)			(6)		(1)	54
B 3	20^{h}	1.2	1.4^{+}	1.5^{+}	2.0		0.4			n.b.			0.3	0.8					+	
	40^{h}	1.1	1.2^{+}	1.4^{+}	2.0		0.5			1.0			+	0.9					+	
	Brutto	(1)	(1)	(1)	(2)					(1)			(1)	(1)					(1)	9
B 4	20^{h}		1.8^{+}	3.1^{+}			1.0					1.0						+		
	Brutto		(2)	(3)			(1)					(1)						(1)		8
B4P1	20^{h}		1.0^{+}	2.1^{+}			0.9											+		
B4P2	20^{h}		0.8^{+}	1.0^{+}								1.0								
B (3+4)	20^{h}	1.2	3.1^{+}	4.2^{+}	2.0		1.4			1.0		1.1	0.7	1.1				+	MetSO+	
B 1 - B 4		20	21	12	15	9	7	11	1	9	8	14	6	7	1		10	3	3	157
Protein		20	21	12	15	9	7	11	1	9	8	14	6	7	1		10	3	3	157

Peptid B 2 (Pos.85-138 nach Homologie mit vulgare)
Anhaltspunkt für die Ableitung der Bruttozusammensetzung von B2 sind die restlichen 6 Arg-Reste der Polypeptidkette des Proteins. Die Bruttozusammensetzung von B2 entspricht der Summe der tryptischen Peptide: T5 (nur C-terminaler Bereich), T6, T7, T8, T9 und T10 (nur N-terminaler Bereich). Die Zusammensetzung des C-terminalen Bereichs von T5 ist: Asx_1, Thr_2, Gly_1, Phe_1, Arg_1, da die Zusammensetzung von T5 bekannt und die des N-terminalen Bereichs von T5 aus der Zusammensetzung von B1 abgeleitet werden kann. Damit sind die in der Zusammensetzung des B2 verbleibenden Aminosäurereste dem N-Terminus von T10 zuzuordnen: Thr_1, Gly_2, Met_1,. Der N-Terminus von B2 wurde durch EDMAN-Abbau in Lösung und Direktanalyse auf Dünnschicht bestimmt:
1.EDMAN: PTH-Gly ; 2.EDMAN: PTH-Thr (neben PTH-Thr sind im Chromatogramm weitere Flecken zu erkennen, die aber in ihren Rf-Werten mit Abbauprodukten des PTH-Thr übereinstimmen);
3.EDMAN: PTH-Phe; bei zwei weiteren Abbauschritten konnte keine Aminosäure mehr als PTH-Derivat nachgewiesen werden.
Der N-Terminus von B2 ist damit homolog mit den Sequenzpositionen 85-87 vom vulgare-Protein.

Peptid B 3 (Pos.139-150 nach Homologie mit vulgare)
Das Peptid B3 enthält Homoserin, kann daher in der Polypeptidkette nicht C-terminal sein und muß als drittes der vier BrCN-Peptide an das Peptid B2 anschließen. Es besteht aus 9 Aminosäureresten gegenüber 12 Aminosäureresten des homologen Sequenzbereiches im vulgare-Protein.

Peptid B 4 (Pos.151-158) nach Homologie mit vulgare)
Das Peptid B4 ist das C-terminale BrCN-Peptid der Polypeptidkette des Hüllproteins, da es keinen als Homoserin nachweisbaren Met-Rest enthält. Es umfaßt 8 Aminosäurereste. Ein Hinweis für die Stellung des Gly-Restes als N-terminale Aminosäure ist die graue Farbe des Komplexes mit Ninhydrin. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Isolierung folgender Partialpeptide, die nach Spaltung von B4 mit Papain erhalten wurden (vgl. Tab.8). Die Sequenz -(Thr,Ser,Ser)-Leu-Ser-Thr wurde durch Endgruppenbestimmung am ganzen Protein nachgewiesen.



Die Bindung der Peptide B3 und B4 miteinander im Protein ist dadurch bewiesen, daß bei einer BrCN-Spaltung in geringer Menge das Dipeptid B(3+4) gefunden wurde (Tab.8).
Die Summe der Aminosäuren-Zusammensetzungen der vier BrCN-Peptide B1 - B4 ist gleich der Aminosäuren-Bruttozusammensetzung des Proteins, so daß bei der Analyse der BrCN-Peptide alle Aminosäure-Reste der Polypeptidkette erfaßt wurden.

5) Zusammenfassung der beim ORSV erzielten Ergebnisse
Die Daten der Aminosäureanalyse des gesamten Proteins und die kombinierten Daten der Aminosäureanalysen der Peptide nach tryptischer und BrCN-Spaltung zeigen übereinstimmend, daß die Polypeptidkette des ORSV-Proteins aus 157 Aminosäureresten zusammengesetzt ist. Die in dieser Arbeit bestimmte Aminosäurezusammensetzung weicht von der früher von PAUL et al. (1965) beschriebenen in den Werten für die Aminosäuren Val, Tyr und Arg, und dadurch auch in der Gesamtzahl der Aminosäurereste pro Polypeptidkette um 1 Aminosäurerest ab. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte werden für wahrscheinlicher gehalten, da die Eich- und Korrekturfaktoren aus gleichzeitig mit der Analyse des ORSV-Proteins durchgeführten Aminosäureanalysen von Aminosäuren-Calibriergemisch bzw. von den Hüllproteinen zweier TMV-Stämme (vulgare und HRG) mit bekannter Aminosäuresequenz bestimmt wurden.
Neun der zehn tryptischen Peptide (T1 - T9; Sequenzbereich Pos. 1-134 nach Homologie mit vulgare) und alle vier BrCN-Peptide wurden in ihrer Aminosäurezusammensetzung analysiert, die Aminosäurezusammensetzung des nicht isolierten C-terminalen tryptischen Peptides (T10; Sequenzbereich Pos. 135-158 nach Homologie mit vulgare) kann aus der Analyse der BrCN-Peptide abgeleitet werden.
Wie die an einigen Peptiden (T2, T3, T4, T6, T8, T9, B4) partiell oder vollständig durchgeführten Sequenzanalysen zeigen, ist die Primärstruktur des ORSV-Hüllproteins der des vulgare-Hüllproteins

ähnlich und von diesem nur durch einzelne Aminosäureaustausche verschieden. Die Primärstruktur der nicht sequenzierten Peptide kann daher vorläufig mit großer Wahrscheinlichkeit aus der Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide durch Homologisierung mit den entsprechenden Sequenzbereichen des vulgare-Proteins abgeleitet werden.

Durch Sequenzanalyse des tryptischen Peptides T3 wurde nachgewiesen, daß in diesem Peptid im Vergleich zu dem homologen Sequenzbereich der Hüllproteine aller bisher untersuchter TMV-Stämme zwei Aminosäurereste zusätzlich vorhanden sind. Außerdem fehlen an anderer Stelle im ORSV-Hüllprotein drei Aminosäurereste im Vergleich zu den Hüllproteinen der meisten bisher untersuchten TMV-Stämme. Diese Deletion ist durch die Analyse der BrCN-Peptide im Sequenzbereich Pos.139-150 lokalisiert. Die genauen Positionen der Deletion in diesem Sequenzbereich sind noch nicht experimentell bestimmt, sind aber nach Homologisierung des BrCN-Peptides B3 mit dem entsprechenden Sequenzbereich des vulgare-Proteins wahrscheinlich die Positionen 146-148.

Insgesamt beträgt der Umfang der Veränderungen bzw. die Mindestzahl der Aminosäureaustausche bei Ableitung der Primärstruktur durch Homologisierung gegenüber dem vulgare-Protein:

im Peptid	T1 (Pos.1-41)	mit 41 Aminosäureresten	7 geänd.Posit.
	T2 (Pos.42-61)	20	5
	T3 (Pos.62-68)	7+2	6
	T4 (Pos.69-71)	3	-
	T5 (Pos.72-90)	19	6
	T6 (Pos.91-92	2	-
	T7 (Pos.93-112)	20	2
	T8 (Pos.113-122	10	-
	T9 (Pos.123-134)	12	2
	T10 (Pos.135-158	24-3	12

Die Primärstruktur des ORSV-Proteins unterscheidet sich damit von der des vulgare-Proteins in (mindestens) 40 der 163 verschiedenen Sequenzpositionen,d.h. in 25,3% der Polypeptidkette. Beim Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen der beiden Proteine unterscheiden sich diese in 33 Aminosäureresten, das sind 21,5%; nur relativ wenige Austausche kompensieren sich also gegenseitig bei der Analyse des gesamten Proteins.

Hüllprotein des B-TMV 1

1) Aminosäureanalyse des ungespaltenen Proteins

S-Protein wurde parallel mit dem des ORSV untersucht und so zur Hydrolyse vorbereitet, wie dort beschrieben ist (S.8). Die Werte der Aminosäureanalysen und die daraus abgeleitete Aminosäure-Bruttozusammensetzung des Proteins sind in Tab.9 wiedergegeben. Die Aminosäurebruttozusammensetzung des B-TMV1-Proteins unterscheidet sich danach von der des dahlemense-Proteins nur darin, daß es einen Ser-Rest weniger und einen Asx-Rest mehr hat.

2) Analyse der tryptischen Peptide

Um den Aminosäureaustausch im Hüllprotein des B-TMV1 gegenüber dem des dahlemense in der Primärstruktur zu lokalisieren und das Vorkommen weiterer, einander kompensierender Aminosäureaustausche auszuschließen, wurde das S-Protein des B-TMV1 enzymatisch mit Trypsin gespalten. Das so erhaltene Peptidgemisch wurde zur isoelektrischen Fällung auf pH 4.3 eingestellt und der Überstand abgetrennt. Die darin gelösten Peptide wurden durch Chromatographie auf Dowex 1 X2 fraktioniert (Abb.6) und papierchromatographisch oder durch Gelchromatographie auf Sephadex G25 gereinigt. Die Werte der Aminosäureanalysen sind in Tab.10 zusammengefaßt.
Im Sediment der isoelektrischen Fällung waren die beiden Peptide T1 und T10 enthalten. T10 konnte daraus durch Chromatographie auf Biogel P10 mit 10%iger Essigsäure isoliert werden. (Abb.6, Tab.10), während das core-Peptid T1 in den eluierten Fraktionen nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Dessen Aminosäure-Bruttozusammensetzung wurde indirekt bestimmt: Analytische Papierchromatographie des Sedimentes und Ausbeuteberechnung des Peptidmaterials zeigten, daß im Sediment neben dem core-Peptid T1 nur das Peptid T10 enthalten ist und beide Peptide darin quantitativ und damit im gleichen Mol-Verhältnis vorliegen. Aus der durch Analyse bestimmten Aminosäure-Bruttozusammensetzung des Sediments wurde daher nach Abzug der durch Analyse bestimmten Aminosäure-Bruttozusammensetzung des Peptides T10 auf die Aminosäure-Bruttozusammensetzung des Peptides T1 geschlossen. Die Summe der ermittelten Aminosäure-Bruttozusammensetzungen aller tryptischen Peptide stimmt mit der Aminosäure-Bruttoanalyse des gesamten Proteins überein.

Tab. 9: Aminosäureanalyse des B-TMV-1- Hüllproteins

Die Daten unter den Hydrolysezeiten geben die Messwerte der Aminosäureanalyse als Molverhältnisse an und sind die Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen. + Nach Korrekturen (vgl. Methoden), a) Bestimmung von Cystein und b) Bestimmung von Tryptophan vergl. Methoden.
c) WITTMANN-LIEBOLD und WITTMANN, 1963

	20^h-Hydrolyse		72^h-Hydrolyse		
nMol Protein	3.9/4.0	2.3/3.2	2.5/2.6	Aminosäurereste gefunden B-TMV-1	Vergleich mit Dahlemense [c]
Asp	17.7	18.2	18.1	18	17
Thr	16.0	16.1	15.0	17	17
+	17.1	17.2	18.0		
Ser	13.8	13.8	11.4		
+	15.0	15.0	14.3	15	16
Glu	18.7	19.2	19.1	19	19
Pro	7.6	7.9	7.7	8	8
Gly	6.1	5.9	6.1	6	6
Ala	11.0	11.0	11.0	11	11
Cys	+	+	+	1 [a]	1
Val	14.7	14.6	15.1	15	15
Met	0.8	n.b.	als MetSO	1	1
Ile	6.1	6.1	6.7	7	7
Leu	12.9	12.8	13.0	13	13
Tyr	5.0	4.8	4.9	5	5
Phe	7.9	7.9	8.1	8	8
Lys	2.3	2.1	2.2	2	2
His				0	0
Arg	9.0	9.0	9.0	9	9
Trp				3 [b]	3
Summe der Aminosäurereste				158	158

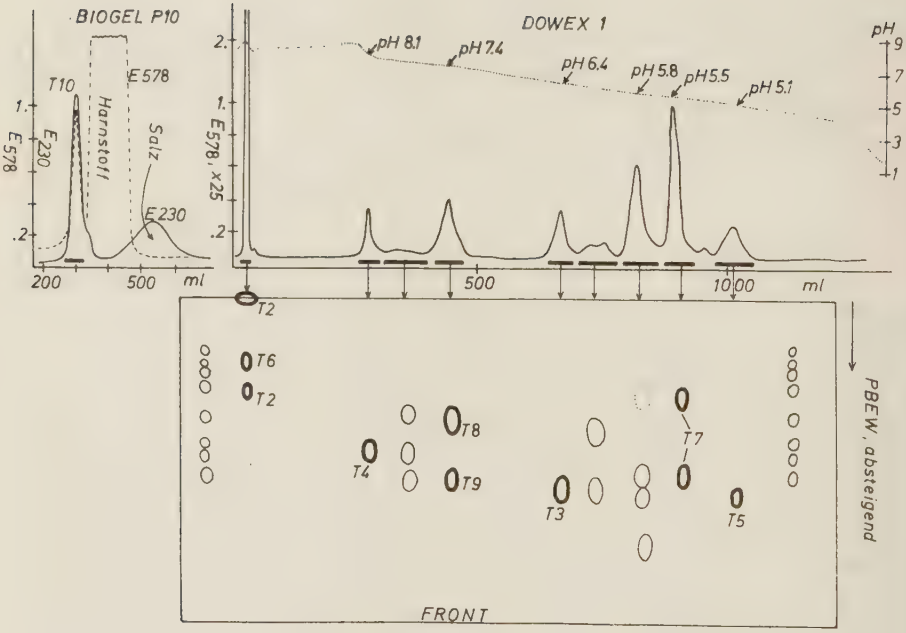


Abb. 6. Trennung der tryptischen Peptide des B-TMV1 - Hüllproteins

Trennung des Sedimentes der isoelektrischen Ausfällung auf Biogel P10, des Überstandes auf Dowex 1 X2 . Test der Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse mit der Ninhydrinreaktion. Papierchromatographie der Peptid-naltigen Fraktionen und Lokalisierung der Peptide auf dem Chromatogramm durch Sprühteste.

Tab. 10: Tryptische Peptide des B-TMV 1 - Hüllproteins
Aminosäureanalysen nach Hydrolyse mit 5.7 n HCl (Mol-Verhältnisse); $^{+}$korrigiert für Hydrolyseverlust; [1] pH-Wert der Elution von Dowex 1

Peptid	Hydrolyse	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Arg	Trp	Summe	pH[1]
T 2	27^{h}	0.4	3.0^{+}	2.6^{+}	5.0	1.8	0.6	0.3	3.0	0.1	0.2		1.9	1.0	1.0	+		
	70^{h}		3.3^{+}	2.1^{+}	5.4	2.3			3.0				2.0	1.0	1.0	+		
	Brutto	-	(3)	(2)	(5)	(2)	-	-	(3)	-	-	-	(2)	(1)	(1)	(1)	20	8.3
T 3	27^{h}	1.0		0.4		0.9	1.1		0.9			0.7	0.8	+				
	70^{h}	0.9		0.4^{+}	0.2	0.8	1.1		1.0			0.3	0.8	+				
	Brutto	(1)	-	-	-	(1)	(1)	-	(1)	-	-	(1)	(1)	(1)	-	-	7	6.4
T 4	20^{h}	0.3		0.3^{+}	0.2				1.0		0.2	0.7			+			
	27^{h}				0.1				1.0			0.5			1.0			
	Brutto	-	-	-	-	-	-	-	(1)	-	-	(1)	-	-	(1)	-	3	8.1
T 5	25^{h}	3.0	2.9^{+}	0.2^{+}	0.2	1.1	1.1	2.0	1.2	1.1	4.1	0.6	1.1		1.0			
	Brutto	(3)	(3)	-	-	(1)	(1)	(2)	(1)	(1)	(4)	(1)	(1)	-	(1)	-	19	5.8
T 6	20^{h}	1.0													1.0			
	70^{h}	1.0		0.1^{+}	0.3				0.1						+			
	Brutto	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)	-	2	8.3
T 7	27^{h}	2.0	3.8^{+}	1.5^{+}	5.0	0.9	0.4	2.0	1.0	1.1	0.9				+			
	20^{h}	1.9	3.9^{+}	1.2^{+}	5.1	1.0		2.0	1.1	1.0	1.0				+			
	70^{h}	1.0	3.9^{+}	1.5^{+}	4.9	0.9	0.4	2.0	1.0	1.6	1.0				+			
	Brutto	(2)	(4)	(1)	(5)	(1)	-	(2)	(1)	(2)	(1)	-	-	-	(1)	-	20	5.5

Fortsetzung von Tab. 10

Peptid	Hydrolyse	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Arg	Trp	Met	Cys	Summe	pH[1]
T 8	27h	1.8	1.0+					2.0	1.9	0.9					+					
	20h	2.0	1.2+	0.2+	0.4			2.0	2.2	1.0			0.1		2.0					
	70h	2.0	1.0+					2.0	1.9	0.9					+					
	Brutto	(2)	(1)	-	-	-	-	(2)	(2)	(1)	-	-	-	-	(2)	-	-	-	10	7.4
T 9	20h	2.5		0.6+	1.0		0.3	1.0	1.9	1.0	1.8				+					
	70h	3.1	0.3+	0.9+	1.0		0.2	1.2	2.0	0.9	1.6				1.2					
	Brutto	(3)	-	(1)	(1)	-	-	(1)	(2)	(1)	(2)	-	-	-	(1)	-	-	-	12	7.6
T1+T10 (pH 4.3	20h	6.0	6.0+	11.1+	7.9	3.0	3.9	4.0	3.7	2.1	6.1	2.0	3.7		+	+	0.6	+		
-Fällg.	50h	6.2	6.1+	10.5+	8.0	3.1	3.8	4.0	4.0	2.1	6.2	1.8	3.8		+	+	($-SO_2$)	+		
direkt)	Brutto	(6)	(6)	(11)	(8)	(3)	(4)	(4)	(4)	(2)	(6)	(2)	(4)	-	(1)	(2)	(1)	(1)	24	
T 10	20h	2.3	3.1+	3.8+	2.0	0.8	2.6	2.0	1.0		2.4	0.9	1.1			+	($-SO_2$)			
	Brutto	(2)	(3)	(4)	(2)	(1)	(3)	(2)	(1)	-	(2)	(1)	(1)	-	-	(1)	(1)	-		
T 1 (=pH4.3-Fällg. Brutto abzügl. T 10 Brutto)	Brutto	(4)	(3)	(7)	(6)	(2)	(1)	(2)	(3)	(2)	(4)	(1)	(3)	-	(1)	(1)	(1)	(1)	41	
T1-T10		18	17	15	19	8	6	11	15	7	13	5	8	2	9	3	1	1	158	
Protein		18	17	15	19	8	6	11	15	7	13	5	8	2	9	3	1	1	158	

3) Ergebnisse der Analyse des B-TMV1 - Proteins

Aus den Aminosaureanalysen der tryptischen Peptide ergibt sich, daß die Aminosäurenzusammensetzungen der Peptide T2 - T10 (Sequenzpositionen 42-158 nach Homologie mit vulgare) völlig übereinstimmen mit den Aminosaurenzusammensetzungen der tryptischen Peptide T2 - T10 des dahlemense-Proteins. Der in der Aminosäure-Bruttozusammensetzung des B-TMV1 - Proteins festgestellte Unterschied in den Werten für Asx und Ser gegenüber dem dahlemense-Protein muß daher durch den Aminosäureaustausch Ser → Asx (oder mehrere einander kompensierende Austausche) im Peptid T1 (dahlemense → B-TMV1) bedingt sein. Das wird durch die indirekte Analyse dieses Peptides bestätigt; das Peptid T1 des B-TMV1 - Proteins enthält einen Asx-Rest mehr und einen Ser-Rest weniger als das homologe Peptid T1 des dahlemense-Proteins. Das Peptid T1 des dahlemense-Proteins hat Ser-Reste in den Positionen 1, 3, 6, 8, 14, 15, 29 und 30. Die genaue Lokalisierung des Austausches im B-TMV1 - Protein wurde nicht experimentell bestimmt. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß sich der Austausch Ser → Asx in Position 29 befindet, da in dieser Position der Austausch Ser → Asx bzw. Asx → Ser bereits mehrfach in den bisher bekannten Primärstrukturen der TMV-Hüllproteine festgestellt worden ist.

Hüllprotein des CPV

1) Aminosäureanalyse des ungespaltenen Proteins

Zur Aminosäure-Bruttoanalyse wurde das S-Protein des CPV parallel mit dem des ORSV und des B-TMV1 in der Weise gereinigt, wie schon auf S.8 im Einzelnen beschrieben ist. Die Daten der quantitativen Aminosäureanalysen sind in Tab.11 wiedergegeben.
Ein auffallender Unterschied in den Werten für die einzelnen Aminosäuren nach Kurz- und Langzeithydrolyse des Proteins besteht nur bei Threonin. Nach Korrektur mit den am TMV vulgare ermittelten Korrekturfaktoren für Hydrolyseverlust ist der Thr-Wert nach 72^{h}-Hydrolyse höher als der nach 20^{h}-Hydrolyse. Es ist möglich, daß die Schwefel-haltigen Seitenketten von Cystein und Methionin und die Huminbildung beim Säureabbau von Tryptophan einen verstärkenden Einfluß auf den Hydrolyseverlust von Threonin haben, wofür auch spricht, daß die Korrekturfaktoren für den Hydrolyseverlust bei sehr voneinander verschiedenen Proteinen etwas unterschiedlich sind. Im CPV-Protein fehlen, im Gegensatz zu den anderen untersuchten TMV-Proteinen, Cys und Met völlig,und es ist nur ein Trp-Rest vorhanden. Eine dadurch bedingte Verkleinerung der Korrekturfaktoren für Hydrolyseverlust sollte sich auf den Thr-Wert nach Kurzzeithydrolyse nur geringfügig auswirken.
Dagegen ist der Unterschied zwischen den Werten für Isoleucin nach Kurz- und Langzeithydrolyse nicht so deutlich, wie bisher bei allen TMV-Hüllproteinen beobachtet wurde und was bei diesen auf das Vorhandensein der Ile-Ile-Peptidbindung in Position 93/94 zurückgeführt werden konnte.
Die aus den Daten der Aminosäureanalysen entsprechend abgeleiteten Werte der Aminosäure-Bruttozusammensetzung des CPV-Hüllproteins sind in Tab.11 angegeben. Dessen Polypeptidkette besteht damit aus 160 Aminosäureresten.

2) Analyse der tryptischen Peptide

Nach der Spaltung des S-Proteins mit Trypsin wurde das Peptidgemisch unmittelbar, d.h. ohne vorherige isoelektrische Fällung über Dowex 1 X2 chromatographiert (Abb.7). Da die Polypeptidkette des CPV-Proteins 12 basische Aminosäurereste (ausgenommen Histidin) enthält, sind maximal 13 tryptische Peptide zu erwarten.

Tab.11: Aminosäurebruttoanalyse des CPV-Hüllproteins

Die Daten unter den Hydrolysezeiten geben die Meßwerte der quantitativen Aminosäureanalyse nach Hydrolyse des isolierten Proteins als Molverhältnisse an. +Nach Korrekturen (vgl. Methoden) a) Bestimmung von Cystein und b) Bestimmung von Tryptophan vergl. Methoden. c) REES und SHORT, 1965

	20^h-Hydrolyse		72^h-Hydrolyse		Aminosäurereste gefunden	Aminosäurereste Literatur c)
nMol Protein	2.1/2.2	0.4	2.0/2.1	2.1/2.4		
Asp	17.9	17.8	18.0	17.7	18	18
Thr	n.b.	18.7	17.3	17.6		
+		20.0	20.7	21.0	20	18
Ser	n.b.	16.0	13.9	13.8		
+		17.5	17.3	17.2	17	16
Glu	16.1	16.0	16.2	16.2	16	16
Pro	7.8	8.2	7.7	7.7	8	8
Gly	4.4	4.6	4.4	4.1	4	4
Ala	12.0	12.0	12.0	12.0	12	11
Val	11.5	11.3	12.1	12.1	12	11
Met	0	0	0	0	0	0
Ile	9.5	8.6	10.0	9.7	10	10
Leu	15.1	14.6	15.2	15.1	15	15
Tyr	7.6	7.6	7.6	7.7	8	8
Phe	6.1	6.4	6.2	6.0	6	6
Lys	n.b.	1.1	n.b.	1.1	1	1
His	n.b.	1.1	n.b.	1.0	1	1
Arg	n.b.	11.0	n.b.	11.0	11	11
Cys	-	-	-	-	0 a)	0
Trp					1 b)	1
Summe der Aminosäurereste					160	155

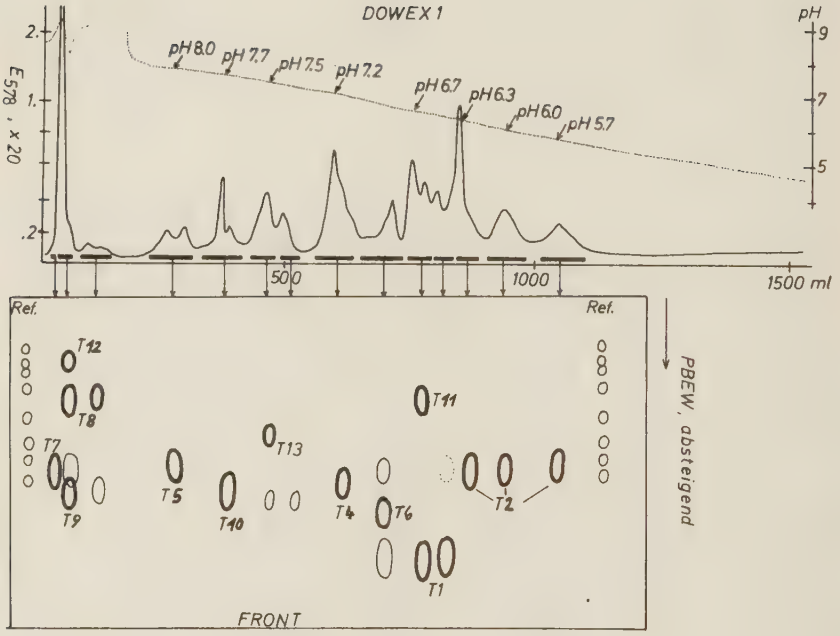


Abb. 7. Trennung der tryptischen Peptide des CPV-Hüllproteins auf Dowex 1 X2 und durch Papierchromatographie

Test der Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse mit der Ninhydrinreaktion. Papierchromatographie der Peptid-haltigen Fraktionen und Lokalisierung der Peptide auf dem Chromatogramm durch Sprühteste. Bezeichnung der Peptide nach abnehmender Größe.

Tab. 12: Tryptische Peptide des CPV-Hüllproteins, Aminosäureanalysen nach Hydrolyse mit 5.7 n HCl (Mol-Verhältnisse); $^{+}$ nach Korrektur für Hydrolyseverlust (vgl. Methoden)

Peptid	Hydrolyse	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Trp	Summe
T 1	18^{h}	3.0	2.5^{+}	2.6^{+}	2.6	2.8	1.0	2.4	2.1	1.9	2.0	2.6	2.0	n.b.	n.b.	n.b.		
	25^{h}	2.6	1.8^{+}	1.9^{+}	2.0	3.4	0.5	2.0	1.9	1.8	1.9	0.5	1.9	n.b.	n.b.	+		
	40^{h}	3.3	2.9^{+}	2.6^{+}	2.6	3.1		2.4	2.1	1.9	1.5	3.8	2.0			1.0		
	40^{h}	3.0	2.4^{+}	2.1^{+}	2.2	2.1	0.8	2.1	1.7	1.7	1.8	1.5	1.9			1.0		
	40^{h}	2.4	2.9^{+}	2.4^{+}	2.0	n.b.		2.0	1.6	1.6	1.6	0.7	1.5			1.1		
	Brutto	(3)	(2-3)	(2)	(2)	(3)	-	(2)	(2)	(2)	(2)	(4-5)	(2)	-	-	(1)		27-29
T 2	25^{h}	5.9	4.2^{+}	2.2^{+}	2.5		2.1	2.2	1.3	0.8	4.7		1.1		0.8	1.1		
	25^{h}	6.0	3.9^{+}	2.3^{+}	2.6		2.3	2.2	1.2	0.9	4.8		1.0		0.8	+		
	Brutto	(6)	(4)	(2)	(2)	-	(2)	(2)	(1)	(1)	(5)	-	(1)	-	(1)	(1)		28
T 3	40^{h}	2.7	3.0^{+}	1.4^{+}	4.3			2.0	3.4	0.6	0.8					0.8		
	40^{h}	3.1	3.1^{+}	1.2^{+}	4.4			2.1	3.8	0.7	1.0					1.0		
	Brutto	(3)	(3)	(1)	(4)	-	-	(2)	(4)	(1)	(1)	-	-	-	-	(1)		20
T 4	25^{h}	1.8	3.7^{+}	2.7^{+}	1.0	+		1.0	0.9	1.0	1.9	0.5		n.b.	n.b.	n.b.		
	60^{h}	1.9	3.7^{+}	3.1^{+}	1.2	1.1		1.0	+	0.9	1.8	+				+		
	Brutto	(2)	(4)	(3)	(1)	(1)	-	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)	-	-	-	(1)		18
T 5	40^{h}		4.2^{+}	3.0^{+}	1.2	+	1.3	1.0	1.0		1.6		0.9			+		
	40^{h}		3.9^{+}	3.2^{+}	1.1	0.8	1.4	1.0	0.9		1.4		1.0			+		
	Brutto	-	(4)	(3)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	-	(1-2)	-	(1)	-	-	(1)	+	16-17
T 6	25^{h}				1.1	2.1		2.0		0.9	1.0	1.4	0.9	n.b.	n.b.	+		
	40^{h}				1.1	2.3		2.0		1.0	1.1	0.6	1.0	n.b.	n.b.	+		
	Brutto	-	-	-	(1)	(2)	-	(2)	-	(1)	(1)	(2)	(1)	-	-	(1)		11

Fortsetzung von Tab. 12:

Peptid	Hydrolyse	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Trp	Sum
T 7	20h	0.3	0.5+	4.0+	1.1	1.1	0.1	0.3	2.6	1.0	0.4			n.b.	n.b.	+		
	40h			4.1+	1.1	0.8			3.0	0.9						1.0		
	40h			4.0+	1.0	1.0			2.8	0.9						0.8		
	Brutto	-	-	(4)	(1)	(1)	-	-	(3)	(1)	-	-	-	-	-	(1)		1
T 8	25h	1.3	1.0+	2.0+	2.0		1.0						0.9			+		
	25h	1.2	0.9+	2.6+	2.0		1.4		0.4				1.0			+		
	40h	1.0	1.1+	2.1+	2.4		1.2						1.0	n.b.	n.b.	n.b.		
	Brutto	(1)	(1)	(2)	(2)	-	(1)	-	-	-	-	-	(1)	-	-	(1)		
T 9	40h	1.0						1.0		1.0	0.9			n.b.	n.b.	n.b.		
	40h	1.0						1.0		1.1	1.1			n.b.	n.b.	n.b.		
	90h	1.0						1.0		0.8	0.8					0.8		
	Brutto	(1)	-	-	-	-	-	(1)	-	(1)	(1)	-	-	-	-	(1)		
T 10	25h			0.2+	1.0		0.1			2.0	1.0			1.0				
	90h				1.0					1.9	1.0			1.0				
	Brutto	-	-	-	(1)	-	-	-	-	(2)	(1)	-	-	(1)	-	-		
T 11	25h	0.9			1.0						1.1					+		
	Brutto	(1)	-	-	(1)	-	-	-	-	-	(1)	-	-	-	-	(1)		
T 12	20h	1.0														0.9		
	25h	1.0	0.1+	0.3+	0.2		0.2									1.9		
	Brutto	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)		
T 13	20h		1.0+					1.0										
	25h		0.9+					1.0										
	Brutto	-	(1)	-	-	-	-	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-		
T1-13		18	19-20	17	16	8	4	12	12	10	15-16	7-8	6	1	1	11	1	
Protein		18	20	17	16	8	4	12	12	10	15	8	6	1	1	11	1	

Aus den Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie wurden durch papierchromatographische Reinigung 13 Peptide isoliert. Die Werte ihrer Aminosaureanalysen sind in Tab.12 zusammengefaßt, und daraus abgeleitet sind die Aminosäure-Bruttozusammensetzungen dieser Peptide. Die Summe dieser Aminosäurezusammensetzungen entspricht der ermittelten Aminosäurezusammensetzung des gesamten Proteins, so daß alle tryptischen Peptide erfaßt wurden.

3) Ergebnisse der Analysen des CPV-Proteins

Die Aminosäure-Bruttozusammensetzung des CPV-Hüllproteins unterscheidet sich von der des vulgare-Proteins in 26 Resten der verschiedenen Aminosäuren, das sind 16,3% der Gesamtzahl aller Reste in der Polypeptidkette. Die tryptischen Peptide sind jedoch in ihrer Länge und in ihrer Aminosäurenzusammensetzung so verschieden von den tryptischen Peptiden der bisher bekannten Hüllproteine von TMV-Stämmen, daß eine Ableitung der wahrscheinlichen Primärstruktur des CPV-Proteins durch Homologisierung nicht möglich ist. Auch die Zuordnung der tryptischen Peptide des CPV-Proteins zu den einzelnen Sequenzbereichen der bekannten TMV-Hüllproteine und damit die Ableitung ihrer Reihenfolge in der Polypeptidkette ist nur schwer allein durch Vergleich zwischen den Aminosäurenzusammensetzungen der Peptide des CPV-Proteins mit den bekannten Primärstrukturen möglich. Am Besten noch gelingt diese Zuordnung zu der Primärstruktur des HRG-Proteins. Sie ermöglicht es, die Mindestzahl der Aminosäureaustausche im CPV-Protein gegenüber dem HRG-Protein zu ermitteln.

Peptid	vermutlich homolog dem Sequenzbereich	Mindestzahl der Austausche im Vergleich zum HRG-Protein
T 1	Pos. 1-27	9
T 9	Pos. 28-32	3
T 8	Pos. 33-41	3
T11	Pos. 42-45	2
T 4	Pos. 46-63	7
T10	Pos. 64-68	5
T 7	Pos. 69-79	5

Peptid	vermutlich homolog dem Sequenzbereich	Mindestzahl der Austausche im Vergleich zum HRG-Protein
T 6	Pos. 80-90	7
T12	Pos. 91-92	-
T 3	Pos. 93-113	9
T 2	Pos. 114-141	6
T 5	Pos. 142-156	9
T13	Pos. 157-158	-

Entsprechend dieser am wenigsten Austausche erfordernden Homologisierung sind im CPV-Protein mindestens 67 Sequenzpositionen gegenüber dem HRG-Protein verändert, das sind 42% der Polypeptidkette. Da jedoch die Primärstruktur des CPV-Proteins so umfangreich verandert ist gegenüber der des HRG-Proteins, können diese Ableitungen nur als vorläufige Anhaltspunkte angesehen werden, bis eine Sequenzanalyse der Peptide des CPV-Proteins durchgeführt ist.

IV. Diskussion

Wie in dem Teil **ERGEBNISSE** im einzelnen beschrieben ist, sind bei den Hüllproteinen der TMV-Stämme ORSV, CPV und B-TMV1 die tryptischen Peptide isoliert worden. Die Primärstruktur einiger Peptide des ORSV-Proteins ist durch Sequenzanalyse nachgewiesen, und die wahrscheinliche Primärstruktur der übrigen Peptide des ORSV-Proteins sowie die der Peptide des B-TMV1-Proteins kann durch Homologisierung mit den Aminosäuresequenzen der Hüllproteine bisher untersuchter TMV-Stämme abgeleitet werden. Dagegen sind in den tryptischen Peptiden des CPV-Proteins die Veränderungen gegenüber den bekannten Primärstrukturen der TMV-Stämme so umfangreich, daß zur Ermittlung der Primärstruktur des CPV-Proteins eine Sequenzanalyse notwendig ist.

Das B-TMV1 ist in der Struktur seines Hüllproteins von der des Stammes dahlemense durch nur einen Aminosäureaustausch verschieden (**Ser → Asx** in Peptid T1, vermutlich Pos. 29), und die Struktur damit möglicherweise identisch mit der des Stammes Y-TAMV (FUNATSU, 1964). Solche geringfügigen Unterschiede in der Primärstruktur des Hüllproteins zwischen TMV-Stämmen, die zum Teil in verschiedenen, geographisch weit auseinander liegenden Regionen isoliert wurden, sind in letzter Zeit mehrfach festgestellt worden (WANG und KNIGHT, 1967; KADO et al., 1968; NOZU und OKADA, 1968). Diese Stämme entsprechen in ihren geringfügigen Unterschieden den unter experimentellen Bedingungen isolierten Mutanten und sind ein Hinweis für die phylogenetische Entwicklung der Struktur des Hüllproteins der Stämme des TMV durch allmähliche Anhäufung einzelner Aminosäureaustausche.

Das Hüllprotein des ORSV weist 25% Aminosäureaustausche gegenüber dem des Stammes vulgare auf. Bemerkenswert an der Struktur dieses Proteins sind vor allem zwei Änderungen, die seine Länge gegenüber den Hüllproteinen der meisten bisher bekannten Varianten des TMV betreffen: Eine Insertion von zwei Sequenzpositionen, die auf eine Duplikation der Positionen 64 und 65 zurückgeführt werden kann, und eine Deletion von drei Sequenzpositionen im C-terminalen Peptid, entsprechend der Homologisierung wahrscheinlich die Positionen 146-148. Diese Änderungen bedingen eine Gesamtlänge der Polypeptidkette von nur 157 Aminosäureresten. Beide betroffenen Sequenzbereiche liegen in der nativen Proteinuntereinheit

des vulgare an bzw. nahe der Oberflache (von SENGBUSCH, 1965; van REGENMORTEL, 1967). Eine Deletion von zwei Aminosäureresten gegenüber dem Protein des vulgare wurde bereits am Hüllprotein des HRG festgestellt (WITTMANN-LIEBOLD und WITTMANN, 1967; FUNATSU und FUNATSU, 1968; WITTMANN et al., 1969). Auch Insertionen sind wahrscheinlich im Hüllprotein anderer TMV-Stämme vorhanden, wie aus den Aminosäure-Bruttoanalysen des gesamten Hüllproteins der Stämme CV4 und CGMMV hervorgeht (van REGENMORTEL, 1967; FUNATSU und FUNATSU, 1968).

Beim CPV ist die Länge der Polypeptidkette des Hüllproteins ebenfalls verschieden von 158 Aminosäureresten. Während allerdings REES und SHORT (1965) aus den Daten der von ihnen durchgeführten Aminosäureanalyse dieses Proteins seine Zusammensetzung aus nur 155 Aminosäureresten angenommen haben, sprechen die in dieser Untersuchung durchgeführten Aminosäureanalysen für eine Länge seiner Polypeptidkette von 160 Aminosäureresten. Eine Insertion von zwei Sequenzpositionen befindet sich vermutlich im Peptid T5, das mit dem Sequenzbereich Position 142-156 des vulgare-Proteins homologisiert werden kann, aber zwei Aminosäurereste länger als dieses ist. Ein Peptid mit sehr ähnlicher Aminosäurenzusammensetzung, das ebenfalls zwei Aminosäurereste länger als der wahrscheinlich homologe Sequenzbereich Position 142-158 des vulgare-Proteins ist, wurde auch vom Protein des TMV-Stammes CGMMV isoliert (FUNATSU und FUNATSU, 1968). Die genaue Lokalisation dieser Insertionen muß jedoch durch weitere proteinchemische Analyse bestimmt werden.

Faßt man die in den Hüllproteinen aller bisher untersuchter TMV-Stämme und nicht-defekter Mutanten vorhandenen Strukturunterschiede zusammen, wird deutlich, daß mehr als 75% aller Sequenzpositionen im Protein dieser Varianten variabel sind (vgl. Abb.8). Trotzdem sind die Tertiärstrukturen der Hüllproteine verschiedener TMV-Stämme einander sehr ähnlich, wie aus dem Vergleich der radialen Verteilung der Elektronendichte im Virusstäbchen einiger dieser Stämme ersichtlich ist (HOLMES und FRANKLIN, 1958; CASPAR und HOLMES, 1969). Von den variierenden Positionen der Aminosaurensequenz sind etwa 56% ausschließlich isopolar substituiert. Aus der von PERUTZ et al. (1965) am Hämoglobin abgeleiteten Regel kann geschlossen werden, daß solche Sequenzpositionen mit ausschließlich isopolarer Substitution an hydrophober bzw. elektrostatischer Wechselwirkung beteiligt sind, die zum Erhalt der funktionsfähigen Tertiärstruktur notwendig sind.

Durch die hochgradige Variabilität der Primärstruktur des Hüllproteins werden die konstant besetzten Positionen in ihrer Bedeutung für die Struktur und Funktion des Proteins hervorgehoben. Besonders auffällig sind die beiden Sequenzbereiche Pos. 87-93 und Pos. 113-122 wegen der außergewöhnlichen Länge ihrer invariablen Aminosäuresequenz. Darauf wurde schon bei früheren Vergleichen der Primärsturkturen der Hüllproteine von TMV-Stämmen hingewiesen (WITTMANN-LIEBOLD und WITTMANN, 1967; FUNATSU und FUNATSU, 1968). Es liegt nahe, diese umfangreichen invariablen Sequenzbereiche mit einer Funktion des Hüllproteins, der Protein-Protein oder der Protein-RNS-Interaktion, in Verbindung zu bringen. Die Protein-Protein-Interaktion beruht jedoch auf hydrophober Bindung (LAUFFER, 1966; JAENICKE und LAUFFER, 1969). An den invariablen Sequenzbereichen ist jedoch die Häufung polarer Aminosäuren bemerkenswert, während die übrigen, vereinzelt in der Sequenz auftretenden invariablen Positionen überwiegend von Aminosäuren mit apolarer Seitenkette besetzt sind.
Die Protein-RNS-Interaktion wurde bisher auf Salzbindung zurückgeführt (CASPAR, 1963). Es gibt jedoch Hinweise, daß die Intensität der Protein-RNS-Interaktion über die Länge des Virusstäbchens variiert (PERHAM, 1969). Das kann aus einer reinen Salzbindung der identischen Protein-Untereinheiten an das Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNS nicht erklärt werden. Aus der Aminosäuresequenz der beiden langen konstanten Regionen des Hüllproteins und aus den bekannten, unten aufgeführten Befunden am TMV ist folgender Mechanismus der Protein-RNS-Interaktion im Virus denkbar:
Die Protein-Untereinheiten sind über Wasserstoffbrücken zwischen den Carboxylgruppen (Acceptoren) der sauren Aminosäuren ihrer konstanten Regionen (Asp-Reste in Pos. 88, 115, und 116) und den Aminogruppen (Donoren) der Purinbasen der Nukleinsäure an die TMV-RNS gebunden. Dadurch ist die Anzahl der zwischen jeder Protein-Untereinheit und der RNS ausgebildeten H-Brücken, und damit die Bindungsintensität, abhängig von der Verteilung der Purinbasen in der RNS. Zusätzlich besteht eine ionische Bindung der basischen Aminosäurereste der konstanten Regionen des Proteins (Arg-Reste in Pos. 90, 92 und 113) an die Phosphatgruppen der RNS. Protein-Untereinheiten, die ausschließlich Pyrimidin-Nukleotiden gegenüberstehen, werden nur durch diese ionische Bindung an die RNS gebunden und ihre Lage in der Quaternärstruktur wird

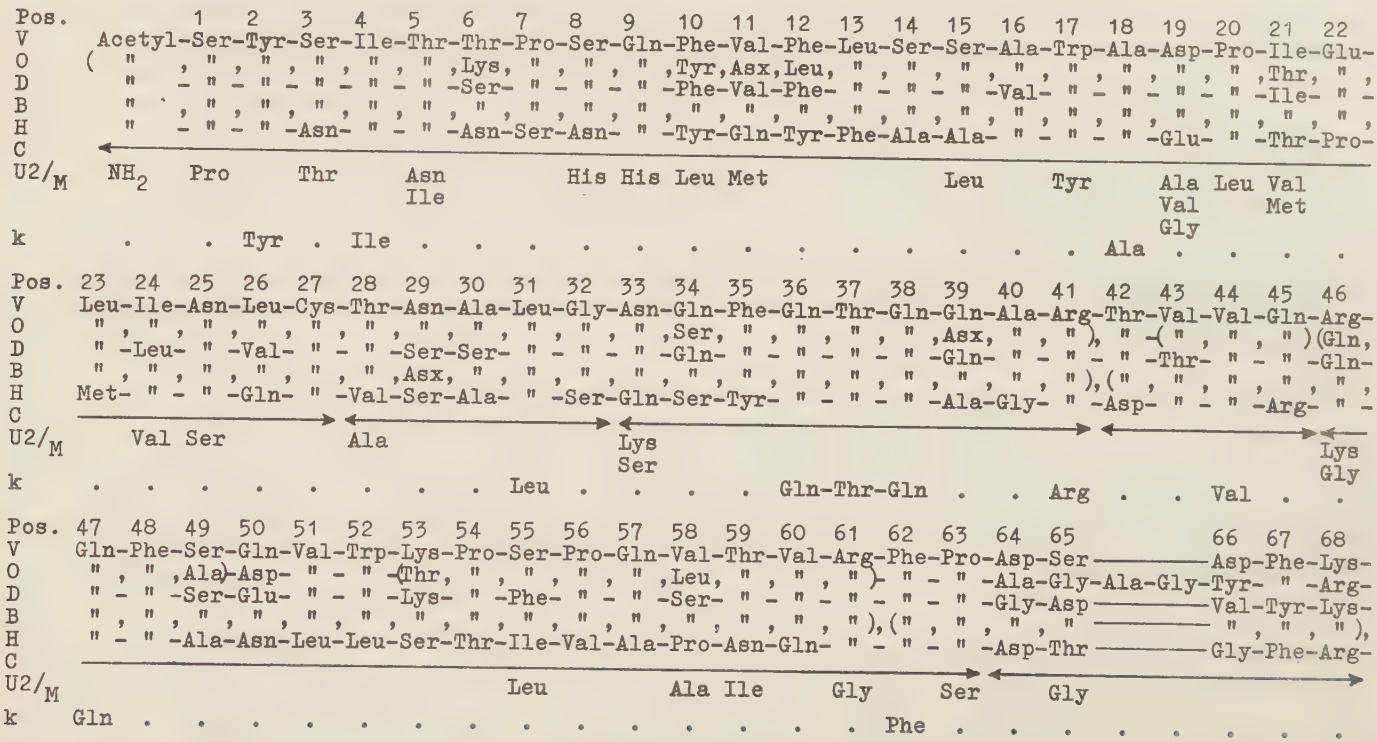
stabilisiert durch Protein-Protein-Interaktion mit Untereinheiten, die an Purinbasen der RNS gebunden sind.
Folgende Befunde unterstützen diese Überlegungen und werden gleichzeitig durch sie erklärt:
1. Strukturelle Voraussetzung:
Die Nukleotidbasen sind in der isolierten RNS in Lösung nicht geordnet, im Virus aber achsenparallel zum Stäbchen ausgerichtet und miteinander in "stacking" (FRANKLIN et al., 1959; BUSH und SCHERAGA, 1967; CHENG, 1968); sie stehen damit in der günstigsten Stellung für eine Interaktion mit dem Protein.
Je drei aufeinander folgende Nukleotide der RNS binden eine Untereinheit des Hüllproteins (FRANKLIN und HOLMES, 1958). Die Primärstruktur der konstanten Regionen der Protein-Untereinheit kann innerhalb der zulässigen Torsionswinkel der Bindungen des Polypeptidrückgrates und der der Seitenketten der Aminosäurereste (vgl. RAMACHANDRAN und SASISEKHARAN, 1968) so gefaltet werden, daß ihre drei Asp- und die drei Arg-Reste in die zur Interaktion mit der RNS notwendige Lage kommen.
2. Wasserstoff-Brückenbindung:
Bei der Beteiligung der Asp-Reste an der Wasserstoff-Brückenbindung sind ihre Carboxylgruppen nicht dissoziiert. Tatsächlich ist bekannt, daß im Virus einige der Carboxylgruppen des Proteins nicht dissoziiert sind; sie dissoziieren erst bei der Ablösung der Protein-Untereinheiten von der RNS (FRAENKEL-CONRAT und NARITA, 1968; SCHEELE und LAUFFER, 1967). Die Funktion und Lokalisation dieser Carboxylgruppen konnten bisher nicht überzeugend nachgewiesen werden (KLUG und CASPAR, 1960; LAUFFER und STEVENS, 1968).
3. Ionische Bindung:
Die Phosphatgruppen der RNS sind im Virus elektrophoretisch nicht wirksam (KRAMER und WITTMANN, 1958), und offenbar durch Arg-Reste des Proteins neutralisiert; denn mehrere Arg-Reste des Proteins sind im Virus gegen Titration mit Farbstoff maskiert, an den isolierten Protein-Untereinheiten aber zugänglich (KAUSCHE und HAHN, 1948). Außerdem ist die Beteiligung einer ionischen Bindung an der Protein-RNS-Interaktion nachgewiesen durch die Abhängigkeit des Viruszerfalls von der Ionenstärke des Dissoziationspuffers (CASPAR, 1963).

4. Nukleotidspezifität:

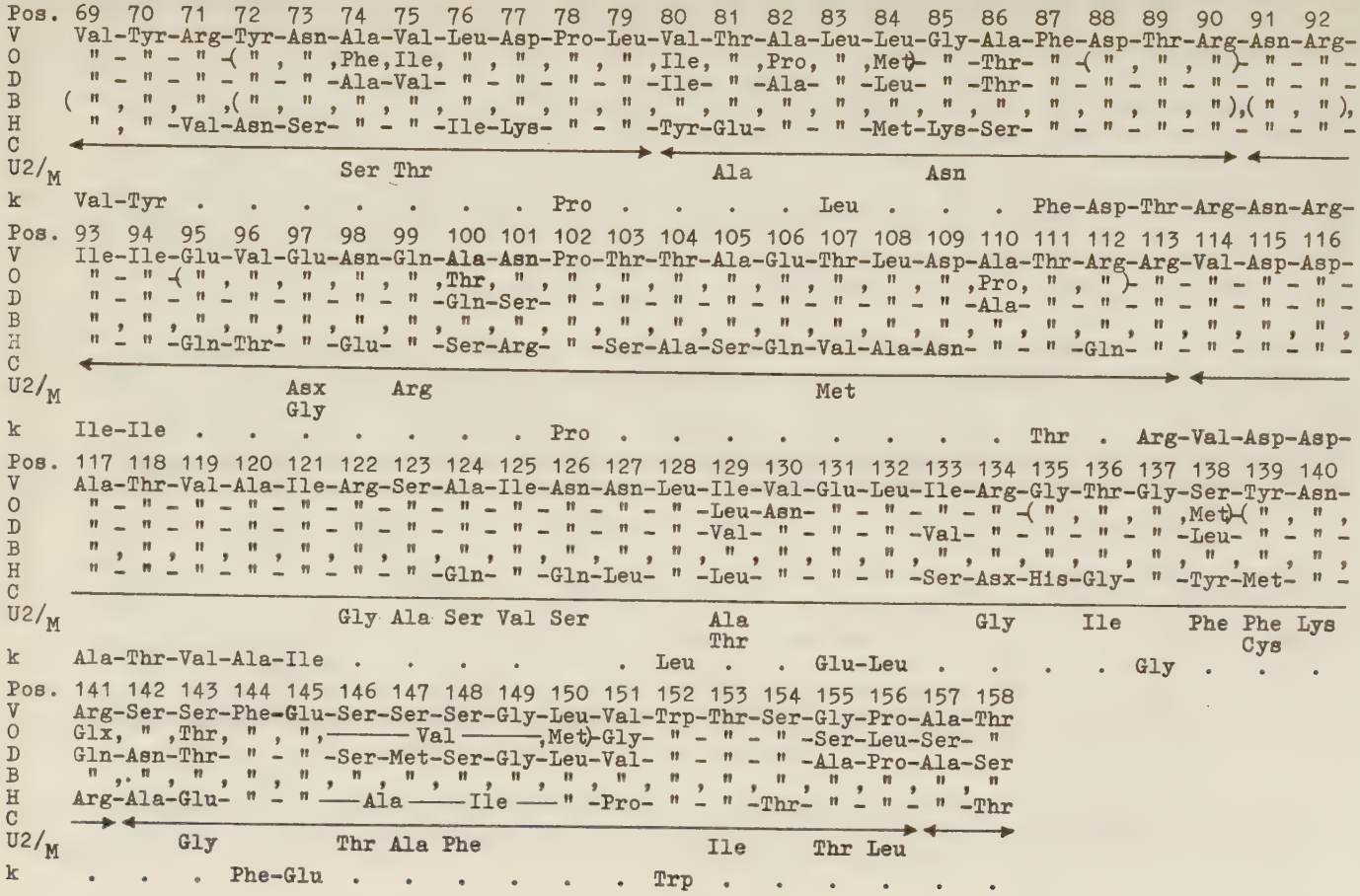
Die Bindung der Untereinheiten des TMV-Hüllproteins über Wasserstoffbrücken ist nur zu den Purinbasen möglich: die Rekonstitution der Protein-Untereinheiten gelingt mit den Purin-Polyribonukleotiden Poly-A und Poly-I, aber nicht mit den Pyrimidin-polyribonukleotiden Poy-C und Poly-U (FRAENKEL-CONRAT und SINGER,1964). Es ist ferner bekannt, daß HNO_2 mit Nukleotidbasen, die an einer Wasserstoff-Brückenbindung beteiligt sind, nur langsam reagiert (SCHUSTER, 1960). Bei der Reaktion von HNO_2 mit intakten TMV-Stäbchen werden die Purinbasen entweder überhaupt nicht (Guanin) oder sehr viel langsamer (Adenin) desaminiert als die Pyrimidinbase Cytosin, während bei der Reaktion von HNO_2 mit isolierter TMV-RNS dieser Unterschied nicht beobachtet wird (SCHUSTER und WILHELM, 1963). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Reaktion von N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin mit intaktem TMV und isolierter TMV-RNS beobachtet (SINGER und FRAENKEL-CONRAT, 1957).
Außerdem entspricht die Anzahl nicht-dissoziierter Carboxylgruppen im Virus (zwischen 3200-4000; FRAENKEL-CONRAT und NARITA,1958) der Summe der Purinbasen in der TMV-RNS (3500; KNIGHT 1952).
Die Ablösung der Protein-Untereinheiten von der TMV-RNS verläuft polar vom 3'-Ende der RNS her (MAY und KNIGHT, 1965). In bestimmten Regionen der RNS treten dabei kurzzeitig stabile Zwischenstufen auf (BUZZEL, 1962; SYMINGTON, 1969), was durch Überwindung intensiver RNS-Protein-Interaktion an Bereichen der RMV-RNS mit Purinhäufungen erklärt werden kann.
Ein direkter Hinweis auf die Beteiligung zumindest der einen konstanten Region des Hüllproteins an der Protein-RNS-Interaktion ist mit Hilfe der TMV-Mutante PM 5 möglich: Die Aminosäuresequenz dieser Mutante unterscheidet sich von der des TMV vulgare nur durch den einen Aminosäureaustausch Arg ⟶ Cys in Position 112 (HARIHARA-SUBRAMANIAN und SIEGEL, 1969). Wenn es gelingt, diesen Cysteinrest, der unmittelbar neben der konstanten Region Pos.113-121 liegt, durch Quecksilber zu markieren, kann durch Röntgenstrukturanalyse die Entfernung von der RNS bestimmt werden.
Die Beteiligung der Carboxylgruppen der drei Asp-Reste der konstanten Regionen des Proteins an deren Wechselwirkung mit der RNS über Wasserstoffbrücken zu den Purinbasen ließe sich folgendermaßen unmittelbar nachweisen: Wenn man die Protein-Untereinheiten mit

Poly-A anstatt mit TMV-RNS rekonstituiert, sollte die Zahl der nicht-dissoziierten Carboxylgruppen auf drei pro Protein-Untereinheit zunehmen.
Auf die vorgeschlagene Weise ließen sich die hier entwickelten, vorerst noch hypothetischen Vorstellungen über die Wechselwirkung zwischen Virus-RNS und Virus-Protein überprüfen.

Abb. 8: Vergleich der tryptischen Peptide der Hüllproteine von ORSV (O), B-TMV 1 (B) und CPV (C) mit den bekannten Primärstrukturen der Hüllproteine von vulgare (V) dahlemense (D) und HRG (H) und Varibilität der Polypeptidkette (einschließlich U2 und Mutanten (M) des TMV). k = invariable Positionen



Fortsetzung von Abb. 8:



V. Zusammenfassung

Die Hüllproteine der TMV-Stämme ORSV, B-TMV1 und CPV wurden proteinchemisch untersucht, und die ermittelten Aminosäurenzusammensetzungen und Partialsequenzen wurden verglichen mit den schon bekannten Primärstrukturen der Hüllproteine der TMV-Stämme.

1) Die Polypeptidkette des ORSV-Proteins ist mit 157 Aminosäureresten um 1 Rest kürzer als die des bekannten vulgare-Proteins; diese Längenänderung ist bedingt durch eine Insertion von 2 Aminosäureresten und eine Deletion von 3 Aminosäureresten. Insgesamt unterscheidet sich die Primärstruktur des ORSV-Proteins von der des vulgare-Proteins in mindestens 40 Sequenzpositionen.

2) Im Protein des B-TMV1 wurde als Unterschied vom bekannten dahlemense-Protein nur der eine Aminosäureaustausch Ser → Asx festgestellt. Dieser Austausch ist im Sequenzbereich Position 1-41 lokalisiert.

3) Die Aminosäureanalyse des CPV-Proteins ergab eine Länge seiner Polypeptidkette von 160 Aminosäureresten. Nach Spaltung mit Trypsin wurden 13 Peptide isoliert. Entsprechend dem Vergleich ihrer Aminosäurenzusammensetzungen mit den bisher bekannten Primärstrukturen der Hüllproteine von TMV-Stämmen unterscheidet sich das CPV-Protein von jedem dieser Proteine in mindestens 40% der Sequenz.

Vergleicht man die bekannten Primärstrukturen der Hüllproteine aller TMV-Varianten, dann erweisen sich 75% aller Sequenzpositionen der Polypeptidkette als variabel. Aus der Invariabilität der Sequenzbereiche Position 87-94 und 113 bis 121, ihrer Aminosäurensequenz und bekannten physikochemischen Daten wird ein Modell über den Mechanismus der Bindung der Proteinuntereinheiten an die RNS im Viruspartikel entwickelt.

VI. Literatur

ANDERER, F.A.: Reversible Denaturierung des Proteins aus Tabakmosaikvirus. Z.Naturforsch. 14b, 642-647 (1959)

- Recent studies on the structure of tobacco mosaic virus. Advanc.Protein Chem. 18, 1-35 (1963)

- H.UHLIG, E.WEBER, and G.SCHRAMM: Primary structure of the protein of TMV. Nature (Lond.) 186, 922-955 (1960)

- B.WITTMANN-LIEBOLD und H.G.WITTMANN: Weitere Untersuchungen zur Aminosäuresequenz des Proteins im Tabakmosaikvirus. Z.Naturforsch. 20b, 1203-1213 (1965)

BARMAN, T.E., and D.E.KOSHLAND,Jr.: A colometric procedure for the quantitative determination of tryptophan residues in proteins. J.biol.Chem. 242, 5771-5776 (1967)

BAWDEN, F.C.: Reversible chnages in strains of tobacco mosaic virus from leguminous plants. J.gen.Microbiol. 18, 751-766 (1958)

BLOMBACK,B., M.BLOMBACK, P.EDMAN, and B.HESSEL: Human fibrinopeptides. Isolation, characterization and structure. Biochim.Biophys.Acta 115, 371-369 (1966)

BRANDES, J., and M.CHESSIN: An electron microscope study on the size of Sammons'Opuntia Virus. Virology 25, 673-674 (1965)

BUSH, C.A., and H.A.SCHERAGA: Optical rotatory dispersion and RNA base pairing in ribosomes and in tobacco mosaiv virus. Biochem. 6, 3036-3042 (1967)

BUTTERWORTH, P.H.W., H.BAUM, and J.W.PORTER: A modification of the Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups. Arch.Biochem.Biophys. 118, 716-723 (1967)

BUZZELL, A.; Action of urea on tobacco mosaic virus.II. The bonds between protein subunits. Biophys.J. 2, 223-233 (1962)

CASPAR, D.L.D.: Assembly and stability of the tobacco mosaic virus. Advanc.Protein Chem. 18, 37-121 (1963)

CASPAR, D.L.D., and K.C.HOLMES: Structure of dahlemense strain of tobacco mosaic virus: a periodically deformed helix. J.mol.Biol. 46, 99-133 (1969)

CHENG, P.Y.: Optical rotatory dispersion, tryptophan location, and base distribution in tobacco mosaic virus. Biochem. 7, 3367-3373 (1968)

CONSDEN, R., A.H.GORDON, and A.J.P. MARTIN: Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. Biochem. J. 38, 224-232 (1944)

DAYHOFF, M.O. (ed.): Atlas of protein sequence and structure, vol.4, 1969, 252 pp., Silver Spring: The National Biomedical Research Foundation 1969

DOWNS, F., and W.PIGMAN: The destruction of serine and threonine during acid hydrolysis. Int.J.Protein Res. 1, 181-184 (1969)

EAKER, D.: The determination of free and protein-bound amino acids. In: Symposium on "Evaluation of novel protein products" Stockholm, Sweden, September 9-11, 1968

EDELHOCH, H.: Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. Biochem. 6, 1948-1954 (1967)

EDMAN, P.: Method for determination of the amino acid sequnece in peptides. Acta Chem.Scandinavica 4, 283-293 (1950)

-, and G.BEGG: A protein sequenator . Europeam J.Biochem. 1, 80-91 (1967)

FRAENKEL-CONRAT, H.: Degradation of tobacco mosaic virus with acedic acid. Virology 4, 1-4 (1957)

-, and K.NARITA: Degradation and structure of tobacco mosaic virus. In: Symposium on protein structure (ed.A.NEUBERGER), p.249-261, New York: Wiley, and London: Methuen 1958

-, and B.SINGER: Reconstitution of tobacco mosaic virus. IV. Inhibition by enzymes and other proteins, and use of polynucleotides. Virology 23, 354-362 (1964)

-, and R.C.WILLIAMS: Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) 41, 690-698 (1955)

FRANKLIN, R.E., D.L.D.CASPAR, and A.KLUG: The structure of viruses as determined by X-ray diffraction. In: Plant pathology, problems and progress 1908-1958 (C.S.HOLDON, ed.), p.447-461, Univ. Wisconsin Press, Madison 1959

-, and K.C.HOLMES: Tobacco mosaic virus: application of the method of isomorphous replacement to the determination of the helical parameters and radial density distribution. Acta Cryst. 11, 213-220 (1958)

FUNATSU, G.: Separation of tryptic peptides of tobacco mosaic virus and strain proteins by an improved method of column chromatography. Biochem. 3, 1351-1355 (1964)

-, and H.FRAENKEL-CONRAT: Location of amino acid exchanges in

chemically evoked mutants of tobacco mosaic virus. Biochem. 3, 1356-1362 (1964)

-,and M.FUNATSU: Chemical studies on proteins from two tobacco mosaic virus strains. In:"Biochemical regulation in diseased plants or injury", Proc.Intern.Sympos. August 17-19,1967 Tokyo Japan, p. 1-9, Tokyo: The Phytopathol. Soc. Japan 1968

GOODING, G.V. , and T.T.HEBERT: A simple technique for purification of TMV in large quantities. Phytopathol. 57, 1285 (1967)

GOODWIN, T.W. and R.A. Morton: The Spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophane in protein.. Biochem. Jour. 40, 628-632 (1946)

GROSS, E., and B.WITTKOP: Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. J.biol. Chem. 237, 1856-1860 (1962)

HARIHARASUBRAMANIAN, V., and A.SIEGEL: Characterization of a new defective strain of TMV. Virology 37, 203-208 (1969)

HOLMES, K.C., and R.E.FRANKLIN: The radial density distribution in some strains of tobacco mosaic virus. Virology 6,328-336(1958)

HUBBARD, R.W.: Studies in accelerated amino acid analysis. Biochem.Biophys.Res. Commun. 19, 679-685 (1965)

JAENICKE, R., and M.A. LAUFFER: Polymerization-depolymerization of tobacco mosaic virus protein. XII.Further studies on the role of water. Biochem. 8, 3083-3092 (1969)

JAUREGUI-ADELL, J., I.HINDENACH und H.G.WITTMANN: Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus, Teil V:Aminosäuresequenz (1-61) des Proteins des Tabakmosaikvirus-Stammes Holmes rib grass. Z.Naturf. 24b, 870-877 (1969)

JENSEN,D.D., and A.H.Gold: A virus ring spot of Odontoglossum orchid: symptoms, transmission, and electron microscopy. Phytopathol. 41, 648-653 (1951)

--Virus diseases of orchids in California. Phytopathol.42, 12 (1952)

JEPSON, J.B. and J.SMITH: "Multiple dipping" procedures in paper chromatography. Nature 172, 1100-1101 (1953)

JEPPSON, J.-O., and J.SJÖQUIST: Thin-layer chromatography of PTH amino acids. Analyt.Biochem. 18, 264-269 (1967)

JOKUSCH, H.: Temperatursensitive Mutanten des Tabakmosaikvirus.II. In vitro-Verhalten. Z.Vererbungsl.98, 344-362 (1966)

- Stability and genetic variation of a structural protein. Naturwiss. 55, 514-518 (1968)

KADO, C.I.,and C.A. KNIGHT: The coat protein gene of tobacco mosaic virus. I.Location of the gene by mixed infection. J.mol.Biol.36, 15-23 (1968)

KADO, C.I., M.H.V.van REGENMORTEL, and C.A. KNIGHT: Studies on some strains of tobacco mosaic virus in orchids.I.Biological, Chemical, and serological studies. Virology 34, 17-24 (1968)

KAUSCHE, G.-A. und F.HAHN: Über stöchiometrische Farbstoffverbindungen des Tabakmosaikvirus. Z.Naturforsch. 3b,437-441 (1948)

KEUTMANN,H.T., and J.T.POTTS, Jr.: Improved recovery of methionine after acid hydrolysis using mercaptoethanol. Analyt.Biochem. 29, 175-185 (1969)

KLUG, A. and D.L.D.CASPAR,: The structure of small viruses, Advanc. Virus Res. 7, 225-325 (1960)

KNIGHT,C.A.: The nucleic acids of some strains of tobacco mosaic virus. J.biol.Chem. 197, 241-249 (1952)

KONIGSBERG, W., and R.J.HILL: The structure of human hemoglobin, III. Jour.Biol.Chem. 237, 2547-2561 (1962)

KOSTKA,V., and F.H.CARPENTER: Inhibition of chymotrypsin activity in crystalline trypsin preparations. J.biol.Chem. 239, 1799-1803 (1964)

KRAMER, E. und H.G.WITTMANN: Elektrophoretische Untersuchungen der A-Proteine dreier Tabakmosaikvirus-Stämme. Z.Naturf.13b, 30-31 (58)

LAUFFER,M.A.: The denaturation of tobacco mosaic virus by urea. II.Kinetic aspects. J.Amer.chem.Soc. 65, 1793-1802 (1943)

- Polymerization-depolymerization of tobacco mosaic virus protein. VII. A model. Biochem. 5, 2440-2445 (1966)

-, and C.L.STEVENS: Structure of the tobacco mosaic virus particle polymerization of tobacco mosaic virus protein. Advanc.Protein Chem. 23 , 1-63 (1968)

LIQUORI, A.M.: Stereochemical code of amino acid residues in polypeptides and proteins. In: Nobel Symposium vol.11, 101-121 (1958)

LISTER, R.M., and TRESH, J.M.: A mosaic disease of leguminous plants caused by a strain of tobacco mosaic virus. Nature 175, 1047-1048 (1955)

LOWRY, O.H., N.J.ROSEBROUGH, ALEWIS FARR, and R.J.RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent.J.biol.Chem. 265-275 (1951)

MAZUR,R.H., B.W.ELLIS, and P.S.CAMMARATA: A new reagent for detection of peptides, nucleotides, and other N-H-containing compounds on paper chromatograms. J.biol.Chem.237,1619-1621(1962)

MAY, D.S., and C.A. KNIGHT: Polar stripping of protein subunits from tobacco mosaic virus. Virology 25, 502-507 (1965)

MOORE,S., and W.H. STEIN: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. Jour.biol.Chem. 211, 907-913 (1954)

NARITA, K.: Isolation of acetylpeptide from enzymic digests of TMV-protein. Biochim.Biophys.Acta(Amst.) 28 , 184- 191 (195)

NAUMAN, L.W.: The formation of esters of glutamic acid and aspartic acid occasioned by the use of methanol in ion exchange chromatography. J.Chromatogr. 36, 398-399 (1968)

NOZU, Y., and Y.OKADA: Amino acid sequence of a common Japanese strain of tobacco mosaic virus. J.mol.Biol. 35, 643-646 (1968)

OPEL, H., H.KEGLER, and J.RICHTER: Vorkommen und Charakterisierung von TMV-Stämmen des Kernobstes. Acta Phytopathol.Acad.Sci. Hungaricae 4, 1-12 (1969)

O'SULLIVAN, M.: Chromatographic spray for the identification of tyrosine, histidine and their amines. Jour.Chromatogr. 25, 485-486 (1966)

PARTRIDGE, A.M., and R.G.WESTALL: Filter-paper partition chromatography of sugars, I. Biochem.Jour. 42, 238-248 (1948)

PAUL,H.L., C.WETTER, H.G.WITTMANN und J.BRANDES: Untersuchungen am Odontoglossum Ringspot Virus, einem Verwandten des Tabakmosaikvirus. I. Physikalische, chemische, serologische und symptomatologische Befunde. Z.Vererbungsl. 97, 186-203 (1965)

PERHAM, R.N.: Sucrose density-gradient analysis of the alkaline degradation of tobacco virus. J.mol.Biol. 45, 439-441 (1969)

PERUTZ,M.F., J.C.KENDREW, and H.C.WATSON: Structure and function of haemoglobin.II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. J.mol.Biol. 13,669-678(1965)

PETERSON,E.A. and H.A.SOBER: Variable gradient device for chromatography. Analyt.Chem. 31, 857-662 (1959)

PTITSYN, O.B.: Statistical analysis of the distribution of amino acid residues among helical and non-helical regions in globular proteins. J.mol.Biol. 42, 501-510 (1969)

RAMACHANDRAN, L.K., The amino acid composition of TMV protein. Virology 5, 244-255 (1958)

RAMACHANDRAN, G.N., and V.SASISEKHARAN: Conformation of polypeptides and proteins. Advanc.Protein Chem. 23, 283-437 (1968)

REES, M.W., and M.N.SHORT: Variations in the composition of two strains of tobacco mosaic virus in relation to their host. Virology 26, 596-602 (1965)

van REGENMORTEL, M.H.: Serological studies on naturally occurring strains and chemically induced mutants of TMV. Virology 31, 467-480 (1967)

REINSCHLER,L.: Aminosäuresequenzen und physikochemisches Verhalten des Hüllproteins eines Wildstammes des Tabakmosaikvirus. I. Analyse der Primärstruktur (Pos.62-134) des Hüllproteins vom Wildstamm U2. Molec.Gen.Genetics 100, 84-95 (1967)

- II. Aggregationsverhalten und Ladungsverteilung im Vergleich zu den Stämmen vulgare und dahlemense. Molec.Gen.Genetics 100, 96-108 (1967)

ROMBAUTS, W., and H.FRAENKEL-CONRAT: Artificial histidine-containing mutants of tobacco mosaic virus. Biochem. 7, 3334-3339 (1968)

RUDLOFF, V. und G.BRAUNITZER: Über Hämoglobine, VI. Ein Verfahren zur präparativen G ewinnung natürlicher Peptide. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 323, 129-144 (1961)

SANGER, F., and E.O.P.THOMPSON: Halogenation of tyrosine during acid hydrolysis. Biochem.Biophys.Acta 71, 468-471 (1963)

SARKAR,S.: Interaction and mixed aggregation of proteins from tobacco mosaic virus strains.Z.Naturforsch. 15b, 778-786 (1960)

SCHEELE, R.B.,and M.A.LAUFFER: Acid-base titrations of tobacco mosaic virus and tobacco mosaic virus protein. Biochem.6, 3076 bis 3081 (1967)

SCHRAMM, G., and W.ZILLIG: Über die Struktur des Tabakmosaikvirus. IV.Mitt.: Die Reaggregation des nucleinsäure-freien Proteins. Z.Naturforsch. 10b, 493-499 (1955)

SCHROEDER, W.A., J.R.SHELTON, and J.B. SHELTON: Application of the paper-strip modification of Edman's method to the determination of amino acid sequence in small peptides. Anal.Biochem. 2, 87-88 (1961)

SCHUSTER, H.: Die Reaktionsweise der Desoxyribonukleinsäure mit salpetriger Säure. Z.Naturforsch. 15b, 298-304 (1960)

-,and R.C.WILHELM: Reaction differences between tobacco mosaic virus and its free ribonucleic acid with nitrous acid. Biochem.Biophys.Acta 68, 554-560 (1963)

von SENGBUSCH, P.: Aminosäureaustausche und Tertiärstruktur eines Proteins. Vergleich von Mutanten des Tabakmosaikvirus mit serologischen und physikochemischen Methoden. Z.Vererbungsl. 96, 364-386 (1965)

SINGER, B. and H.FRAENKEL-CONRAT: Chemical modification of viral RNA, VI. The action of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 58, 234-239 (1967)

SIPOS, T., and J.R.MERKEL: Temperature-dependent activation of trypsin by calcium. Biochem.biophys.Res.Commun. 31, 522-527(1968)

SJÖQUIST, J.: Determination of amino acids as phenyl thiohydantoin derivatives.III.Quantitative determination of 3-phenyl-2-thiohydantoins from paper chromatograms. Biophys.Acta 41, 20-30(1960)

SMITH, J.: Colour reactions on paper chromatograms by a dipping technique. Nature 171, 43 (1953)

SPACKMAN, D.H., W.H.STEIN, and S.MOORE: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Analyt.Chem. 30, 1190 (1958)

SYMINGTON, J.: Linear variation in stability of tobacco mosaic virus to stripping of protein by detergent. Virology 38, 309 bis 316 (1969)

TAKAHASHI, W.N.: Ultraviolet absorption as a measure of tobacco mosaic virus nucleo-protein. Phytopath. 41, 142-145 (1951)

TSUNG, C.M., and H.FRAENKEL-CONRAT: Preferential release of aspartic acid by dilute acid treatment of tryptic peptides. Biochem. 4,793-800 (1965)

WALEY, S.G. and J.WATSON: The action of trypsin on polylysine. Biochem. Jour. 55, 328-337 (1953)

WANG, A.L., and C.A.KNIGHT: Analysis of protein components of tomato strains of tobacco mosaic virus. Virology 31, 101 bis 106 (1967)

WITTMANN,H.G.: Proteinuntersuchungen an Mutanten des Tabakmosaikvirus als Beitrag zum Problem des genetischen Codes. Z.Vererbungsl. 93, 491-530 (1962)

- Proteinanalysen von chemisch induzierten Mutanten des Tabakmosaikvirus. Z.Vererbungsl. 95,333-344 (1964)

- Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus,

Teil IV: Aminosäuresequenzen (1-61 und 135-158) des Proteins des Tabakmosaikvirus-Stammes U2. Z.Naturforsch. 20b, 1213-1223 (1965)

-,I.HINDENNACH und B.WITTMANN-LIEBOLD: Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus, Teil VI: Aminosäuresequenz (Pos. 62-156) des Proteins des Tabakmosaikvirusstammes Holmes ribb grass. Z.Naturforsch. 24b, 877-885 (1969)

WITTMANN-LIEBOLD, B. und H.G.WITTMANN: Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus. Aminosäuresequenzen des Proteins des Tabakmosaikvirusstammes dahlemense. Teil III. Diskussion der Ergebnisse. Z.Vererbungsl. 94 (427-435 (1963)

- - Teil I. Position 42-134 Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem 335, 69-116 (1964)

- - Lokalisierung von Aminosäureaustauschen bei Spontanmutanten und nach Fluoruracil-Einbau isolierten Mutanten des Tabakmosaikvirus. Z.Vererbungsl. 97, 218-225 (1965)

- - Lokalisierung von Aminosäureaustauschen bei Nitritmutanten des Tabakmosaikvirus. Z.Vererbungsl. 97, 305-326 (1965)

- - Coat proteins of strains of two RNA viruses: comparison of their amino acid sequences. Molec.Gen.Genetics 100, 358-363 (1967)

Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

Aminosäuren wurden in der üblichen Schreibweise nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature abgekürzt.

Ac.. (z.B. Ac2)	Peptid nach Essigsäurespaltung
B.. (z.B. B4)	Peptid nach BrCN-Spaltung
B-TMV1	Birnen-TMV 1
C.. (z.B. C1)	Peptid nach Chymotrypsin-Spaltung
C'ase	Carboxypeptidase
CGMMV	Cucumber green mottle mosaic virus
CPV	Cowpea Virus
C-terminal	Carboxylterminal
CV 4	Cucumber Virus 4
D1	Dowex 1
E	Extinktion
G (10, 25 bzw. 50)	Sephadex G10, G25 bzw. G50
HRG	Holmes' Ribb Grass
LAP	Leucinaminopeptidase
N-terminal	Aminoterminal
ORSV	Odontoglossum Ringspot Virus
P.. (z.B. P1)	Peptid nach Papain-Spaltung
P2	Biogel P2
poly A, C, I bzw.U	Homopolyribonukleotid aus Adenyl-, Cytidyl-, Inosyl- bzw. Uracilsäure
Pp	Papierchromatogramm
PTH-	Phenyltniohydantoin-Derivat
RNS	Ribonukleinsäure
Ref	Aminosäuren-Referenzgemisch
S.. (z.B. S3)	Peptid nach Subtilisin-Spaltung
SOV	Sammons' Opuntia Virus
T.. (z.B. T5)	Peptid nach Trypsin-Spaltung
TMV	Tabakmosaikvirus

Lebenslauf

Am 15.7.1943 wurde ich, Bernd Hennig, in Leipzig geboren als Sohn des Zoologen Prof.Dr.Dr.h.c. Willi Hennig und seiner Ehefrau Irma Hennig, geborene Wehnert.
Vom Herbst 1949 an besuchte ich in Berlin die Schule und bestand im Frühjahr 1963 das Abitur am mathematisch - naturwissenschaftlichen Zweig der 5.Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges in Berlin.
Im Sommersemester 1963 begann ich das Biologiestudium an der Technischen Hochschule in Stuttgart. Seit dem Wintersemester 1964/65 war ich immatrikuliert an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität in Tübingen mit dem Ziel der Promotion in den Fächern Genetik (Hauptfach) und Biochemie und Zoologie (Nebenfächer).
Meine Dissertation führte ich durch vom Januar 1967 bis März 1970 im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem, unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. H.G. Wittmann.
Seit Dezember 1969 bin ich verheiratet.

Meine Ausbildung verdanke ich den akademischen Lehrern

für Genetik:	Prof.Dr. W. Seyffert, Prof.Dr. H.G. Wittmann, Prof.Dr. A. Gierer
für Biochemie:	Prof.Dr. G. Weitzel, Prof.Dr. H. Metzner
für Zoologie:	Prof.Dr. K.G. Grell, Prof.Dr. V. Schwartz, Prof.Dr. O. Pflugfelder

Meinem wissenschaftlichen Lehrer, Herrn Prof.Dr. H.G. Wittmann, danke ich sehr für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für großzügige und anregende Arbeitsmöglichkeiten. Frau Dr. B. Wittmann-Liebold möchte ich herzlich dafür danken, daß sie mich in die Methoden der Proteinchemie eingeführt hat.
Zu Dank verpflichtet bin ich außerdem Herrn Prof.Dr. G. Melchers, Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen, für die wiederholte Überlassung von Virus.